

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21259

研究課題名(和文) 乳酸菌のムーンライティングタンパク質の網羅的解析と多機能性マーカーへの応用

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of moonlighting proteins of lactic acid bacteria and its application to multifunctional markers

研究代表者

木下 英樹 (Kinoshita, Hideki)

東海大学・農学部・講師

研究者番号：50533288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ムーンライティングプロテインは乳酸菌が持つ多機能性タンパク質であり、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)やGroELはその代表例である。PBS抽出菌体表層タンパク質のプロテオーム解析を行ったところ、解糖系などの酵素群、ヒートショックプロテイン、リボソームタンパク質などが同定された。

次にrGAPDHとrGroELのA型抗原に対する結合能を試験した結果、結合が確認された。また、GAPDHと重金属耐性の関連性について解析した。その結果、菌体表層GAPDHはカドミウムを吸着し毒性緩和に寄与している一方で、水銀では吸着後、菌体内に取り込まれることで毒性が増している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Moonlighting protein is a multifunctional protein possessed by lactic acid bacteria, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and GroEL are representative moonlighting proteins. Many proteins such as glycolytic enzymes, heat shock proteins, and ribosomal proteins were identified by proteome analysis of PBS extract from bacterial cell surface.

Next, rGAPDH and rGroEL showed the ability to bind to type A blood type antigen. The relationship between GAPDH and heavy metal tolerance in lactic acid bacteria were researched. In a cadmium, it was suggested that the cell surface GAPDH adsorbs cadmium and contributes to alleviating the toxicity. In a mercury, however, mercury may be toxic by taking it into the bacterial cell after adsorption. Mercury is also adsorbed by GAPDH whereas cytotoxicities were enhanced in the presence of cell surface GAPDH. It suggests that mercury may be incorporated into the bacterial cells after adsorption.

研究分野：応用微生物学

キーワード：多機能性タンパク質 GAPDH GroEL ムーンライティングプロテイン 重金属 腸管付着性 乳酸菌
菌体表層タンパク質

1. 研究開始当初の背景

プロバイオティック乳酸菌は、近年の研究の加速により整腸作用、血中コレステロール低減作用、免疫賦活化作用、制癌作用など様々な生理効果が知られるようになった。これらの機能性分子は、乳酸、ペプチド、細胞外多糖、オリゴDNAなどが知られているが、菌体表層タンパク質が機能性を有している場合も数多く報告されている。しかしながら、これらの研究分野において横断的な研究は殆どなく、一つの機能性の解析に留まっている。これまでタンパク質は、1つのタンパク質に対して、1つの機能しか持たないと考えられてきたが、近年の多くの研究の蓄積から、1つのタンパク質が複数の機能を有していることが分かってきた。このような多機能性タンパク質は、ムーンライティングタンパク質 (moonlighting protein: 以下、MP) と呼ばれている。

当研究室ではこれまで乳酸菌の腸管付着性に関する研究を行ってきた。その研究の過程で、ヒト大腸ムチンに対し、高い付着性を示した乳酸菌から腸管付着因子として、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (以下、GAPDH) を発見した。GAPDH は、本来、細胞内で解糖系の酵素として働いている重要な酵素であるが、細胞表層では腸管付着因子として働く MP であることが明らかになった。GAPDH は、ヒト大腸ムチンやその糖鎖末端に発現している血液型抗原 (A 型および B 型抗原) に高い結合能を有していた。また、その他の研究では、ラミニン、フィブロネクチンおよびコラーゲンに結合性を示すマルチ結合能を持つことが報告されている。さらに、表層 GAPDH はプラスミノゲンに結合し、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) によるプラスミノゲン活性化を促進させる作用があることが分かっている。溶血性連鎖球菌などの多くの病原性細菌でも表層 GAPDH は見つかっており、侵襲性に関与していると考えられている。

これらのことから、プロバイオティック乳酸菌の表層 GAPDH の多機能性は、その他にも数多くの機能を有しているのではないかと考えた。また、GAPDH 以外にも乳酸菌の菌体表層にはヒートショックプロテイン GroEL、エノラーゼ、エロンゲーションファクター Tu 等も存在することが報告されており、その他にも多くの MP が存在するのではないかと予測した。

2. 研究の目的

本研究では MP を網羅的に探索すると共に、MP として有力な GAPDH および GroEL の多機能性を解析し、“機能性マーカー”として利用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MP の網羅解析

MP はイオン結合により菌体表層に留まっていることが知られているため、様々な種の乳酸菌基準株 12 菌株を培養し、PBS により菌体表層タンパク質を抽出した。透析、凍結乾燥を行った PBS 抽出タンパク質のプロテオーム解析をイオントラップ飛行時間ハイブリット型質量分析装置 (LCMS-IT-TOF) により行った。

(2) GAPDH と GroEL の組換え体の作製

Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* JCM 1149^T から *gapdh* 遺伝子を、*L. johnsonii* JCM 2012^T から *groel* 遺伝子を PCR により増幅した。PCR 産物を pMD20-T vector に組み込み、*Escherichia coli* DH5 に導入した。*E. coli* DH5 を培養後、プラスミドを抽出し、制限酵素し、pET-28b ベクターに再度組み込んだ。ベクターを *E. coli* Rosetta2 に導入し、組換えタンパク質発現株を得た。次いで、rGAPDH および rGroEL が可溶性となる条件を検討し、Metal Affinity

Resins を用いて、組換えタンパク質を精製した。

(3) 血液型抗原への結合性試験

水晶振動子 QA-A9M AU(SEP) を 15 分間ピラニア溶液に漬け洗浄した後、蒸留水にて洗浄した。15-carboxy-pentadecanethiol 溶液に洗浄した水晶振動子を浸漬し、37℃、10 分静置した。次いで、エタノール、蒸留水の順に水晶振動子を洗浄後、Amine Coupling Kit を用いて ABO 式血液型 A 抗原を金盤に固定化した。固定化した水晶振動子を水晶振動子測定システム QCM922A に設置し、rGAPDH および GroEL 溶液を送液し、血液型抗原への結合性を解析した。

(4) 重金属耐性試験

蒸留水洗浄と PBS 洗浄の違いにおけるカドミウムおよび水銀耐性試験を行った。本試験では、菌体表層における GAPDH 酵素活性が高い *L. rhamnosus* MYU 45 (以下、MYU 45 株)、*L. sakei* MYU 65 (以下、MYU 65 株)、および *L. casei* MYU 83 (以下、MYU83 株) と活性が低い *L. plantarum* MYU 93 (以下、MYU93 株) を用いた。菌を培養後、蒸留水または PBS で 3 回洗浄後、MIC 付近のカドミウムまたは水銀を添加した。3 時間静置した後、乳酸菌の生菌数を測定した。結果は重金属を添加していない時の生菌数を 100 とした時の菌の減少率 (%) で示した。

4. 研究成果

(1) MP の網羅解析

PBS 抽出物のプロテオーム解析の結果、多くの乳酸菌から、解糖系などの酵素群、ヒートショックプロテイン、リボソームタンパク質、その他のタンパク質など多種多様なタンパク質が同定された。特に GAPDH、エノラーゼ、フルクトースビスホスホアルドラーゼ、GroS、DNA 結合タンパク質、ホスホキャリアータンパク質 HPr、ホスホグリセリン酸キナーゼ、チオレドキシンは多くの乳酸菌の菌体

表層から検出された。これらは全て菌体内のタンパク質として知られているが、菌体表層にも発現していることが明らかとなり、多機能性を有している可能性が示唆された。

(2) rGAPDH と rGroEL の血液型抗原への結合性試験

遺伝子クローニングを行い、大腸菌にプラスミドを導入し、His タグを付加した rGAPDH および rGroEL の大量発現株を構築した。培養条件の検討によりこれらの組換えタンパク質を可溶性画分に回収することが出来た。それらを精製し、ABO 式血液型 A 抗原への結合性を試験した。その結果、GAPDH および GroEL の A 抗原への結合性が確認された (図 1)。特に GroEL は GAPDH よりも結合量が多く、BSA と比較して優位に高い値を示した ($p < 0.05$)。GAPDH は以前の我々の研究で A および B 抗原へ結合することが分かっているが、GroEL も A 抗原へ結合することが本実験で初めて明らかとなった。

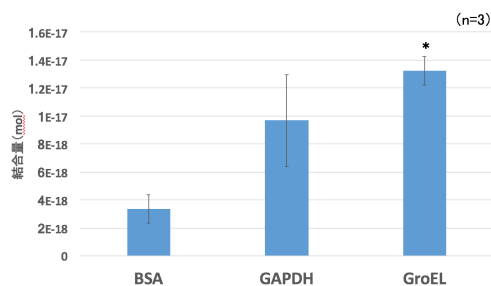


図1. GAPDHおよびGroELの血液型抗原(A抗原)への結合性試験結果 vs. BSA * $p < 0.05$

(3) MP と重金属耐性との関連性試験

GAPDH と重金属耐性の関連性について解析した。MP はイオン結合で菌体表層に留まっており PBS で容易に抽出されるが蒸留水では抽出されないことが分かっている。そこで GAPDH 酵素活性の高い乳酸菌を蒸留水または PBS で洗浄し、カドミウムおよび水銀に暴露し生菌数を比較した。

カドミウム曝露による蒸留水洗浄菌体と PBS 洗浄菌体の生菌数測定の比較では、全ての菌株において PBS 洗浄の方が有意に菌の生存率が減少した ($p < 0.01$) (図 2)。このこと

から、菌体表層 GAPDH がカドミウムの毒性緩和に寄与している可能性が示唆された。以前の我々の研究で、MYU 45 株では PBS 洗浄菌体の方がカドミウム吸着率が高く、MYU 65 株および MYU 83 株では、逆の結果を示すことが明らかとなっている。これらのことから、MYU 45 株では、菌体表層 GAPDH の下層にカドミウムを吸着し、菌体内に取り込むようなメカニズムが存在している可能性が考えられた。また、MYU 65 株および MYU 83 株では、菌体表層 GAPDH がカドミウムを吸着し、取り込みが阻害されることで、カドミウムの毒性緩和が起こっている可能性が考えられた。

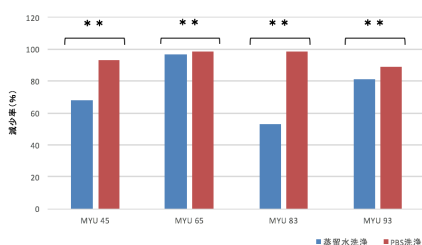


図2. 蒸留水およびPBS洗浄菌体におけるカドミウム毒性の比較

** : p<0.01

一方、水銀では MYU 45 株では PBS 洗浄菌体の方が減少率が高かったが、他の菌株では逆の結果を示した(図3)。以前の水銀吸着試験では、MYU 45 株では PBS 洗浄菌体の方が、水銀吸着率が高く、MYU 65 株および MYU 83 株では、蒸留水洗浄菌体の方が水銀吸着率が高かった。これらのことから、水銀は GAPDH に吸着されるが、吸着されることで菌体内への取り込み量が増加し、毒性を発揮している可能性が示唆された。

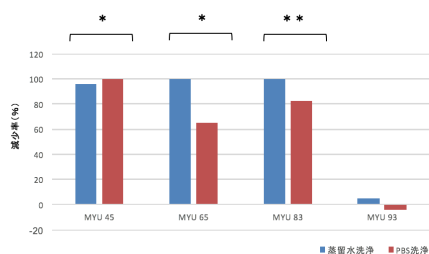


図3. 蒸留水およびPBS洗浄菌体における水銀毒性の比較

* : p<0.05 ** : p<0.01

以上のように、菌体表層 GAPDH はカドミウムを吸着し毒性緩和に寄与している一方で、水銀では毒性増強を招いている可能性が示唆され、カドミウムと水銀では吸着や取り込み機序が異なっている可能性が示唆された。また、表層 GAPDH の存在の有無で重金属耐性が変化し、金属の取り込みに関与している可能性があることから、表層 GAPDH は、マグネシウム、マンガン、鉄などの必須ミネラルを取り込む役割を果たしている可能性も示唆された。現在、これらのメカニズムを解明するために 3D 立体構造解析により、GAPDH の重金属結合部位や結合様式について解析している。

本研究では、MP を網羅的に解析し、様々な MP と思われるタンパク質を見出した。また、菌体表層における GAPDH や GroEL の働きの一部を解明することが出来た。今後、さらに研究を続け、MP の機能性マーカーとしての利用を模索していきたい。

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2件)

1. Kinoshita H, Watanabe M, Igoshi K, Ishida M, Kawai Y, Kitazawa H, Miura K, Horii A, Saito T, *Lactobacillus plantarum* LA 318 inhibits the adhesion of *Candida albicans* ATCC 26555 to human colonic mucin, 東海大学農学部紀要、査読有、36、2017、pp.7-14、<http://www2.kuma.u-tokai.ac.jp/kiyou-nougaku/pdf/tokai-agri-proceedings-36.pdf>
2. Kinoshita H, Ohuchi S, Arakawa K, Watanabe M, Kitazawa K, Saito T,

Isolation of lactic acid bacteria bound to the porcine intestinal mucosa and an analysis of their moonlighting adhesins、Biosci. Microbiota Food Health、査読有、35、2016、pp.185-196、
<http://doi.org/10.12938/bmfh.16-012>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 英樹 (KINOSHITA, Hideki)
東海大学・農学部・バイオサイエンス学科・
講師

研究者番号：50533288

〔学会発表〕(計3件)

1. 木下英樹, 森下光貴, 井越敬司. 「重金属耐性における菌体表層ムーンライティングプロテインの役割の検討」日本畜産学会第123回大会(信州大学伊那キャンパス), 2017年9月6~7日
2. 木下英樹, 田上誠吾, 緒方美月, 井越敬司. 「乳酸菌のムーンライティングプロテインの網羅的解析」2017年度酪農科学シンポジウム(十和田文化センター), 2017年8月18日
3. 木下英樹, 大内聡子, 荒川健佑, 渡辺真通, 北澤春樹, 齋藤忠夫. 「ブタ腸管ムチンからの乳酸菌の分離とムーンライティング付着因子の網羅解析」日本畜産学会第120回大会(酪農学園大学), 2015年9月11~12日.(口頭)

〔図書〕(計3件)

1. 北本勝ひこ、春田伸、丸山潤一、後藤慶一、尾花望、斉藤勝晴、朝倉書店、食と微生物の事典、2017、512(376-377)
2. Brian Henderson、Wiley-Blackwell、Moonlighting proteins -Novel virulence factors in bacterial infections、2017、472(225-243)
3. 齋藤忠夫、伊藤裕之、岩附慧二、吉岡俊満、朝倉書店、ヨーグルトの事典、2016、440(255-263)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuma.u-tokai.ac.jp/~kinolab>