

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18681

研究課題名(和文) 乳酸菌に見出された酸素応答性の好気性グリセロール代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification and analysis of genes involved in the regulation of aerobic glycerol metabolism of lactic acid bacteria

研究代表者

土肥 裕希 (Doi, Yuki)

岡山理科大学・工学部・研究員

研究者番号：20705412

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)：乳酸菌 *Enterococcus faecalis* のグリセロール代謝を担う酵素遺伝子は、グリセロールまたはグリセロールと酸素によって発現が誘導される。しかしながら、その代謝制御に関与する遺伝子は未同定であった。

本研究では、*E. faecalis* の *in vitro* でのトランスポゾン変異株作製法を構築し、それを用いてグリセロールの好気代謝に必要な遺伝子を複数見出した。それらを解析した結果、*E. faecalis* の好気性グリセロール代謝では、核酸の生合成のため、糖新生によるピルビン酸からのリボースの供給が極めて重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The expression of genes encoding the enzymes required for glycerol metabolism of the lactic acid bacterium *Enterococcus faecalis* is induced by glycerol or glycerol and oxygen; however, the genes involved in the regulation of glycerol metabolism are yet to be identified.

In the present study, we performed *in vitro* transposon mutagenesis of *E. faecalis* and identified several genes required for aerobic glycerol metabolism. Experiments using these transposon mutants indicated that the supply of ribose synthesized via gluconeogenesis is essential for nucleic acid biosynthesis in aerobic glycerol metabolism of *E. faecalis*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 *Enterococcus faecalis* グリセロール代謝 トランスポゾン 糖新生

1. 研究開始当初の背景

グリセロール資化性乳酸菌 *Enterococcus faecalis* のグリセロール代謝を担う酵素遺伝子の発現は、グリセロール応答性の転写制御因子によって制御されていることが示唆されている。しかしながら、その制御に関与する遺伝子・タンパク質は同定されておらず、グリセロール代謝酵素遺伝子の発現制御機構は未解明であった。

2. 研究の目的

微生物(細菌)のグリセロール代謝経路は2つ存在し、それぞれ脱水素経路とリン酸化経路と呼ばれる。前者の経路ではグリセロールが酸化された後にリン酸化され、後者の経路ではグリセロールがリン酸化された後に酸化される。いずれも生じるのはジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)であり、DHAP以降は解糖系に従って代謝される。乳酸菌 *E. faecalis* は、脱水素経路とリン酸化経路の両方の酵素遺伝子を有しており、いずれの経路でもグリセロールを代謝(異化)することが可能である(図1)。



図1. *E. faecalis* のグリセロール代謝経路とその代謝を担う酵素。

E. faecalis の脱水素経路を担う酵素遺伝子そしてリン酸化経路を担う酵素遺伝子は、それぞれがひとつの遺伝子クラスターを形成している。脱水素経路を担う酵素をコードした遺伝子クラスターの発現はグリセロールによって誘導される一方で、リン酸化経路を担うその発現はグリセロールかつ十分な酸素の存在によって誘導される。これは、*E. faecalis* のリン酸化経路では、酸化剤として酸素が使用されるためであると考えられている(図1)。

以上の背景から、*E. faecalis* にはグリセロール応答性の転写制御因子が存在し、リン酸化経路においてはその制御機構にさらに酸素応答性の制御因子が関与することが示唆された。しかしながら、それらの制御因子は同定されておらず、その制御機構も未解明である。そこで本研究では、*E. faecalis* (W11株) のトランスポゾン変異株作製法を構築してグリセロールの好気代謝に必要な遺伝子を網羅的に同定し、グリセロール応答性の転写制御因子とそれに関与する酸素応答性の制御因子を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) トランスポゾンを用いた *E. faecalis* W11 株のランダム変異株作製法の構築

トランスポゾン(Tn) 遺伝子は、プラスミド pMOD-3 を用いて作製された。pMOD-3 のマルチクローニングサイトに構成的な発現を示す *E. faecalis* のプロモーター配列を挿入し、その下流にグラム陽性菌由来の抗生物質耐性遺伝子を挿入した。そのプラスミドを鋳型として、5' 末端がリン酸化したプライマーを用いて Tn 遺伝子をモザイクエンド配列から PCR によって増幅した。増幅された Tn 遺伝子をアガロースゲル電気泳動に供した後、それをゲルから精製し、トランスポザゼと混合してトランスポゾームを作製した。トランスポゾームの *E. faecalis* への導入は、エレクトロポレーション法を用いた。

(2) グリセロール資化性が低下・消失した Tn 変異株の選別とその Tn 挿入部位の決定

得られた Tn 変異株をグリセロールを炭素源として含む改変 MRS 平板培地にて好気培養し、生育すなわちグリセロール資化性が著しく低下、あるいは消失した Tn 変異株を選別した。続いて、その Tn 変異株から全ゲノム DNA を単離し、主要な制限酵素を用いてそれを消化した。反応液を熱処理に供して制限酵素を失活させ、エタノール沈殿によって精製した後、それにリガーゼを添加してライゲーション反応を行った。その反応液を大腸菌 EC100 株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを単離した後、シークエンサーを用いて Tn が挿入された周辺のゲノム DNA の塩基配列を解析した。

(3) グリセロール代謝に必要な遺伝子の同定とその機能解析

プラスミドを用いて候補遺伝子(Tn が挿入された遺伝子やその周辺遺伝子) を変異株に再導入し、変異株のグリセロール資化性を相補した遺伝子をグリセロール代謝に必要な遺伝子として同定した。また、同定された遺伝子のグリセロール代謝における機能は、アノテート情報を基にした生理試験(各炭素源の資化性など)で行い、そのグリセロールに対する応答性は逆転写-PCR を用いることで解析した。

4. 研究成果

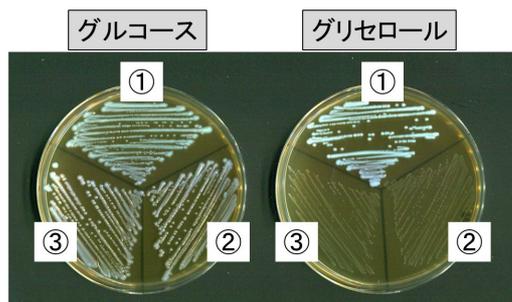
(1) トランスポゾンを用いた *E. faecalis* W11 株のランダム変異株作製法の構築

トランスポゾン(Tn) 遺伝子に搭載する薬剤耐性マーカー遺伝子は、広宿主域間(*E. faecalis* と大腸菌)で構成的に発現することが求められる。逆転写-PCR およびレポーターアッセイの結果、*E. faecalis* の乳酸脱水素酵素(LdhL1)のプロモーターがその条件を満たすことを見出した。そこで、その LdhL1

遺伝子のプロモーター配列を pMOD-3 の Tn 遺伝子内部にクローニングし、その下流に薬剤耐性遺伝子を挿入した。薬剤耐性遺伝子として、まずは *E. faecalis* で最も選択性が高いテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子を用いたが、培養条件によっては Tc がそのグリセロール代謝を阻害することが明らかになった。そこで、Tc に代わってクロラムフェニコール耐性遺伝子を用いることで、外因性物質 (抗生物質) の影響を受けない *E. faecalis* の Tn 変異株の作製と量産に成功した。

(2) Tn 挿入部位の決定

作製した約 3,000 株の Tn 変異株から、野生株 (W11) と比較して好気条件下でのグリセロール資化性が著しく低下、あるいは消失した Tn 変異株を 22 株獲得し、そのうちの 19 株で Tn が挿入された遺伝子の決定に成功した。Tn 挿入部位が最も重複した遺伝子は、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (Fbp, EC:3.1.3.11) およびピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PpdK, EC:2.7.9.1) で、これらは糖新生を担う酵素である (図 2)。その他には、NADH ペルオキシダーゼ、DNA 合成とその修復酵素、細胞壁合成酵素、グリコシドヒドロラーゼ、トランスポーターなどが検出された。その一方で、グリセロールや酸素応答性の転写制御因子をコードしていると考えられる遺伝子は見出せなかった。



左の平板培地は 50 mM グルコースを、右の平板培地は 100 mM グリセロールを炭素源として含む。① 野生株 (W11)、② Δfbp 株、③ $\Delta ppdK$ 株。

図 2. 野生株とグリセロール資化性が低下した変異株の生育比較。

(3) グリセロール代謝に必要な遺伝子の同定とそれにコードされた酵素タンパク質の機能解析

上記の結果を受けて、まずは最も変異部位が重複して得られた *fbp* 遺伝子変異株 (*fbp* 株) および *ppdK* 遺伝子変異株 (*ppdK* 株) を解析した。これら変異株のグリセロール資化性の低下は、プラスミドを用いた *fbp* または *ppdK* 遺伝子の再導入によってそれぞれ回復したことから、*fbp* および *ppdK* 遺伝子がグリセロールの好気代謝に必要な遺伝子であることが明らかになった。グリセロール以外の炭素源に対する資化性を調べたところ、これらの遺伝子変異株は共にグルコース、フルクトース、グルコン酸、リボースに対する資

化性に低下は認められなかったが、ピルビン酸の資化性に対してはグリセロールと同様に著しい低下が認められた。このピルビン酸およびグリセロール資化性の低下は、いずれかのリボヌクレオシドをわずかに添加することで回復したが、ヌクレオシドの添加では回復が認められなかった。これらの結果から、*E. faecalis* の好気性グリセロール代謝では、グリセロールが解糖系を経てピルビン酸に変換された後、ピルビン酸が再び解糖系を逆流してペントース・リン酸経路を介して核酸合成のためのリボースに変換されており、そのリボースの供給が当該代謝に極めて重要であることが明らかになった。

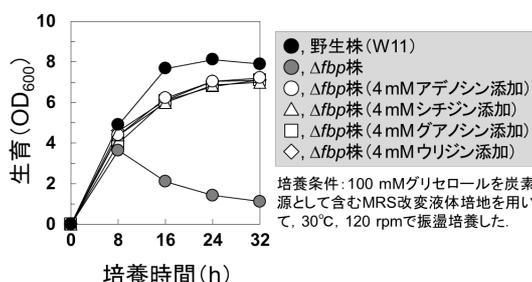
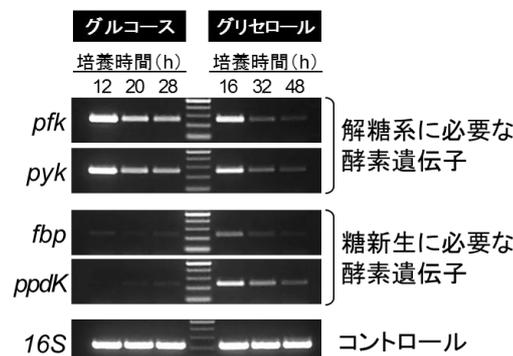


図 3. グリセロールを炭素源とした野生株および *fbp* 株の生育 (*ppdK* 株も同様の結果)。

続いて、解糖系および糖新生に関与する酵素遺伝子の転写レベルを、グルコースを好気代謝している W11 株とグリセロールを好気代謝している W11 株と比較した。糖新生酵素をコードした *fbp* および *ppdK* 遺伝子の転写レベルは、グルコースよりもグリセロールを代謝している W11 株で明らかに向上していた (図 4)。一方で、解糖系のみに必要な酵素をコードした *pfk* および *pyk* 遺伝子の転写レベルは、グリセロールを代謝している W11 株では下方制御されていた (図 4)。なお、解糖系・糖新生のいずれの経路にも必要な酵素遺伝子の転写レベルには差は認められなかった。これらの結果は、解糖系と糖新生、特に糖新生に必要な酵素遺伝子の転写がグリセロールあるいはその代謝で生じる物質・細胞内環境に応答していることを示唆した。



pfk, 6-phosphofructokinase; *pyk*, pyruvate kinase; *fbp*, fructose-1,6-bisphosphatase; *ppdK*, pyruvate phosphate dikinase; 16S, 16S rRNA 遺伝子。

図 4. 逆転写-PCR を用いた解糖系および糖新生を担う酵素遺伝子の転写解析。

このように、本研究では *E. faecalis* の in vitro での Tn 変異株作製法を用いて、グリセロールの好気代謝に必要とされる遺伝子を複数見出し、その一部を同定することに成功した。細菌、特に乳酸菌における糖新生の役割に関する報告は極めて限定的であったことから、グリセロール代謝における *fbp* および *ppdK* 遺伝子の役割を見出した本研究成果の学術的価値は高いと思われる。今後は、糖新生の嫌気性グリセロール代謝への寄与を検証すると共に、さらに Tn 変異株の作製を継続し、目的とするグリセロール応答性の転写制御因子とそれに関与する酸素応答性の制御因子を見出していきたい。

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 1 件)

1. Doi Y., Takizawa N. (2016) Complete genome sequence of *Enterococcus faecalis* strain W11, isolated from algal food product. Genome Announcements (American Society for Microbiology, USA), vol.4, No. 5, pii: e01037-16.

[学会発表](計 1 件)

1. 土肥 裕希「乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の好気性乳酸発酵の発現メカニズムの解明」日本農芸化学会 2017 年度大会 京都, 2017 年

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土肥 裕希 (Yuki Doi)
岡山理科大学・工学部・研究員
研究者番号：20705412

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()