

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05403

研究課題名(和文) 枯草菌の二次代謝産物ネオトレハロサジアミンによる代謝調節機構の解析

研究課題名(英文) Impact of Activation of the Neotrehalosadiamine/Kanosamine Biosynthetic Pathway on the Metabolism of *Bacillus subtilis*

研究代表者

稲岡 隆史 (INAOKA, TAKASHI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：40391205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペントースリン酸(PP)経路は、解糖系やTCA回路とともに中心代謝を構成する重要な経路であり、NADPH合成や核酸合成に不可欠なペントースの合成に関与する。グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)はPP経路の最初の酵素であり、この酵素の欠損株では細胞内NADPHレベルが著しく低下する。本研究により、glcP遺伝子破壊によっておこるNTD過剰生産がTCA回路の代謝中間体を蓄積させ、NADPH量を野生株レベルにまで回復することがわかった。これらの結果は、NTDが枯草菌を含むバチルス属細菌の代謝制御シグナルとして機能する可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

枯草菌を含む複数のバチルス属細菌が生産するネオトレハロサジアミン(NTD)はカノサミン2分子が結合した機能不明のオートインデューサーである。NTD/カノサミンは自身の生合成経路を活性化することによりTCA回路の代謝中間体を増大させることが判明した。これはNTD/カノサミンが細菌の中心的な代謝経路を直接または間接的に調節することを示唆しており、菌体外物質を活用した細菌集団の代謝制御技術の開発へと繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：The pentose phosphate (PP) pathway is one of the major sources of cellular NADPH. A *B. subtilis* *zwf* mutant that lacks glucose-6-phosphate dehydrogenase (the enzyme that catalyzes the first step of the PP pathway) showed inoculum-dose-dependent growth. This growth defect was suppressed by *glcP* disruption, which causes the upregulation of an autoinducer neotrehalosadiamine (NTD)/kanosamine biosynthetic pathway. A metabolome analysis showed that the stimulation of NTD/kanosamine biosynthesis caused significant accumulation of TCA cycle intermediates and NADPH. Because the major malic enzyme *YtsJ* concomitantly generates NADPH through malate-to-pyruvate conversion, de novo NTD/kanosamine biosynthesis can result in an increase in the intracellular NADPH pool via the accumulation of malate. In fact, a *zwf* mutant grew in malate-supplemented medium. Our results suggest that NTD/kanosamine has the potential to modulate the carbon-energy metabolism through an autoinduction mechanism.

研究分野：応用微生物学

キーワード：グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ ペントースリン酸経路 NADPH オートインデューサー ネオトレハロサジアミン カノサミン メタボローム 枯草菌

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。

1. 研究開始当初の背景

複数のパチルス属細菌が生産する二次代謝産物ネオトレハロサジアミン (NTD) は、カノサミン (3-アミノグルコース) 2 分子が結合したアミノ糖であり、NTD 自身が転写制御因子 NtdR を介して NTD 生合成遺伝子の発現を誘導するオートインデューサーとして機能する。また、NTD 生合成遺伝子下流に存在するグルコーストランスポーター遺伝子産物 (GlcP) がグルコース取り込みに連動して NTD 生合成遺伝子の発現を抑制していることも判明している。研究代表者は NTD がグルコース代謝に関連した菌体外シグナルであると推測し、研究を推進してきた結果、GlcP 遺伝子破壊によって起こる NTD 過剰生産がグルコース 6リン酸デヒドロゲナーゼ (Zwf) 欠損株の増殖能を回復することを発見した。Zwf はペントースリン酸経路の最初の酵素であり、NADPH 合成に重要であることから、オートインデューサーである NTD が細菌の中心的な代謝経路を直接または間接的に調節することを示唆している。

2. 研究の目的

NADPH の合成はペントースリン酸経路と TCA 回路で合成されるため、Zwf 欠損株における NADPH 合成は TCA 回路に依存すると考えられる。従って、Zwf 欠損株が増殖できない培養条件下では、TCA 回路が不活性化されていると推察される。GlcP 遺伝子破壊によって起こる NTD 過剰生産が Zwf 欠損株の増殖能を回復することから、NTD 合成経路とエネルギー代謝との関連性が示唆される。本研究では、NTD 合成経路が TCA 回路などの中心的な代謝経路へ及ぼす影響を分子生物学的・生化学的手法を用いて検証し、NTD を介した代謝調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

本研究に使用した菌株は表1に示した。zwf::neo破壊株 (TI443) は Uwe Sauer 博士より頂いた株の DNA を用いて 168 株を形質転換することにより作製した。TI444 及び TI445 株は、以前作製した glcP::spc 株及び ntdABC::cat 株を TI443 株の DNA を用いて形質転換することにより得られた。TI352 及び TI481、TI482 株は ntdABC 遺伝子プロモーター (P_{ntdABC}) 活性を測定する為に用いた。TI480 株はプラスミド pM_UtinT3 を ntdABC 遺伝子ターミネーター (T_{ntdABC}) の上流に挿入して構築した。

表1 使用菌株

Strain	Genotype
168	<i>trpC2</i>
TI352	<i>trpC2 amyE::</i> (P _{ntdABC} - <i>lacZ</i> , <i>cat</i>)
TI443	<i>trpC2 Δzwf::neo</i>
TI444	<i>trpC2 Δzwf::neo ΔglcP::spc</i>
TI445	<i>trpC2 Δzwf::neo ΔntdABC::cat glcP::spc</i>
TI480	<i>trpC2 zwf::neo ntdC</i> -pM _U tinT3-T _{ntdABC} - <i>glcP</i>
TI481	<i>trpC2 ntdR::neo amyE::</i> (P _{ntdABC} - <i>lacZ cat</i>)
TI482	<i>trpC2 ntdA::Tn 10 amyE::</i> (P _{ntdABC} - <i>lacZ cat</i>)

(2) 培地

枯草菌の培養には LB 培地 (10 g/L トリプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L NaCl) 及び S7N 培地 [10 mM 硫酸アンモニウム、5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)、100 mM MOPS 緩衝液 (pH7.0)、20 mM グルタミン酸ナトリウム、2 mM MgCl₂、0.7 mM CaCl₂、50 μM MnCl₂、5 μM FeCl₃、2 μM チアミン、1% グルコース、0.1% Nutrient Broth] を用いた。

(3) メタボローム解析

枯草菌 168 及び TI443 (zwf)、TI444 (zwf glcP)、TI445 (zwf ntdABC glcP) 株を LB 培地で 16 時間培養後、

S7N培地に2%植菌して、37℃でODが0.2になるまで培養した。菌体をフィルターろ過し、MilliQ水で洗浄後、フィルターをメタノールに浸漬し、代謝産物を抽出した。回収した抽出液に内部標準物質（メチオニンスルホン、2-モルホリノエタンスルホン酸、D-しょうのう-10-スルホン酸）を添加し、限外ろ過後、CE-TOF MSにより細胞内代謝産物を比較した。

(4) NADPH定量

細胞内NADPHはAmplite Colorimetric NADPH Assay Kit (AAT Bioquest) を用いて測定した。

(5) TCA回路の各酵素活性測定

アコニターゼ活性はEnzyChrom Aconitase Assay Kit (Bioassay System)、フマラーゼ活性はEnzyChrom Fumarase Assay Kit (Bioassay System)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ活性はEnzyChrom Isocitrate Dehydrogenase Assay Kit (Bioassay System) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) カノサミンはNTD生合成遺伝子を誘導するオートインデューサーとして機能する

他の研究グループにより、NTD生合成オペロンにはカノサミン合成に必要な酵素がコードされているが、カノサミン2分子を結合する最終反応を触媒する酵素は含まれていないことが報告された。そこで、カノサミンがオートインデューサーとして機能するかどうかを検証するため、

NTD生合成オペロンプロモーター (P_{ntdABC}) を *lacZ* 遺伝子に連結したレポーター株を利用して、カノサミンの培地への添加効果をNTDと比較した(図1)。その結果、NTDを合成しないTI482株においてもカノサミン添加により P_{ntdABC} が活性化された(図1A)。NtdR欠損株では P_{ntdABC} の活性化が起こらなかったことから、カノサミンもNTDと同様にNtdRを介して P_{ntdABC} を活性化することが判明した。また、カノサミンの添加効果はNTDと同程度であった(図1B)。

(2) 枯草菌のグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ破壊株の増殖特性

ペントースリン酸経路はNADPHや核酸合成に必要であり、多くの二次代謝生成にも関与していることが知られている。ペントースリン酸経路の最初の酵素であるグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(Zwf)欠損株(TI443)はLB天然培地では増殖することができるが、グルコースを含む半合成培地

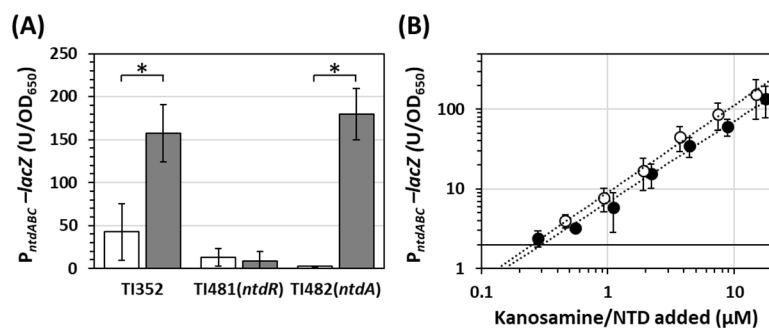


図1 カノサミン添加効果

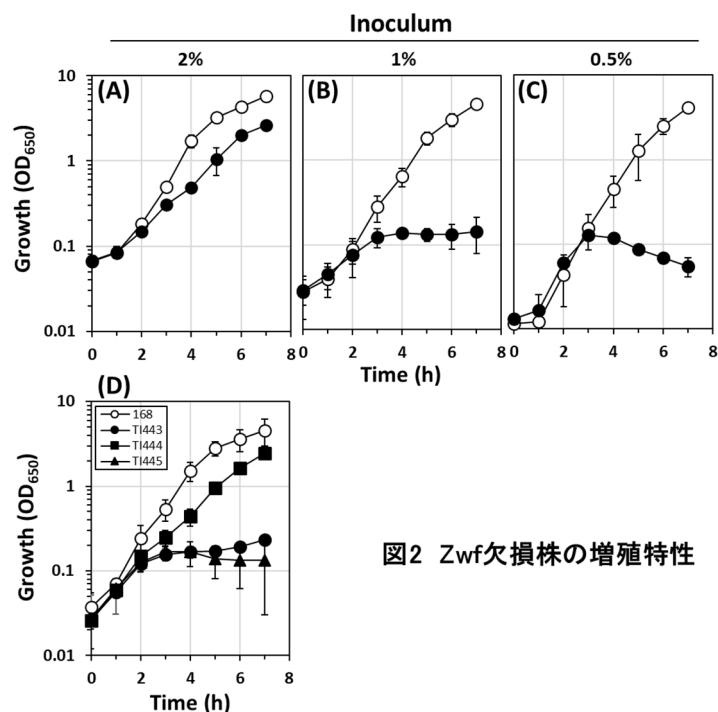


図2 Zwf欠損株の増殖特性

(S7N)では植菌量に依存した増殖を示す(図2A-C は Zwf 欠損株、 は野生株)。この Zwf 欠損株の増殖能の低下は NTD/カノサミン過剰生産を引き起こす GlcP 欠損(TI444)によって回復した(図2D)。この効果は、NTD 生合成遺伝子欠損株(TI445)では起こらない(図2D)ことから、NTD/カノサミン過剰生産が Zwf 欠損株の増殖能を回復するものと考えられた。

(3)代謝における NTD/カノサミン過剰生産の効果

これら破壊株における代謝変化を観察するため、メタボローム解析を行なった(図3)。Zwf 欠損株(TI443)では予想通り、ペントースリン酸経路の代謝産物や NADPH 量が顕著に低下していた。一方、GlcP 欠損株(TI444)ではペントースリン酸経路の代謝産物は依然として低下していたが、TCA 回路の代謝産物が顕著に増加しており、細胞内 NADPH 量も野生株レベルに回復していることがわかった。そこで、TCA 回路の酵素のうち、アコニターゼ及びイソクエン酸デヒドロゲナーゼ、フマラーゼ活性を測定したが、各変異株で顕著な活性の増加は認められなかった(データは示さず)。NTD 生合成遺伝子欠損株(TI445)では TI444 株で観察された代謝産物量の変化は観察できなかった。TI444 株ではカノサミンと一致する代謝産物が蓄積していることから、NTD/カノサミン生合成が活性化されていることがわかる。カノサミン合成にはアミノ基転移反応が関わっているが、

グルタミン酸がアミノ基の供与体として働き、2-オキソグルタル酸が蓄積するものと考えられた。また、リンゴ酸は *ytsJ* 遺伝子産物によりピルビン酸へ変換される際に NADPH を生じることが知られている。TI444 株では NADPH レベルが野生株レベルに回復していることから、*glcP* 遺伝子破壊による Zwf 欠損株の増殖回復効果は NTD 合成を活性化することにより TCA 回路の代謝中間体が蓄積し、細胞内 NADPH 量を増加させたことに起因しているものと推察できる。

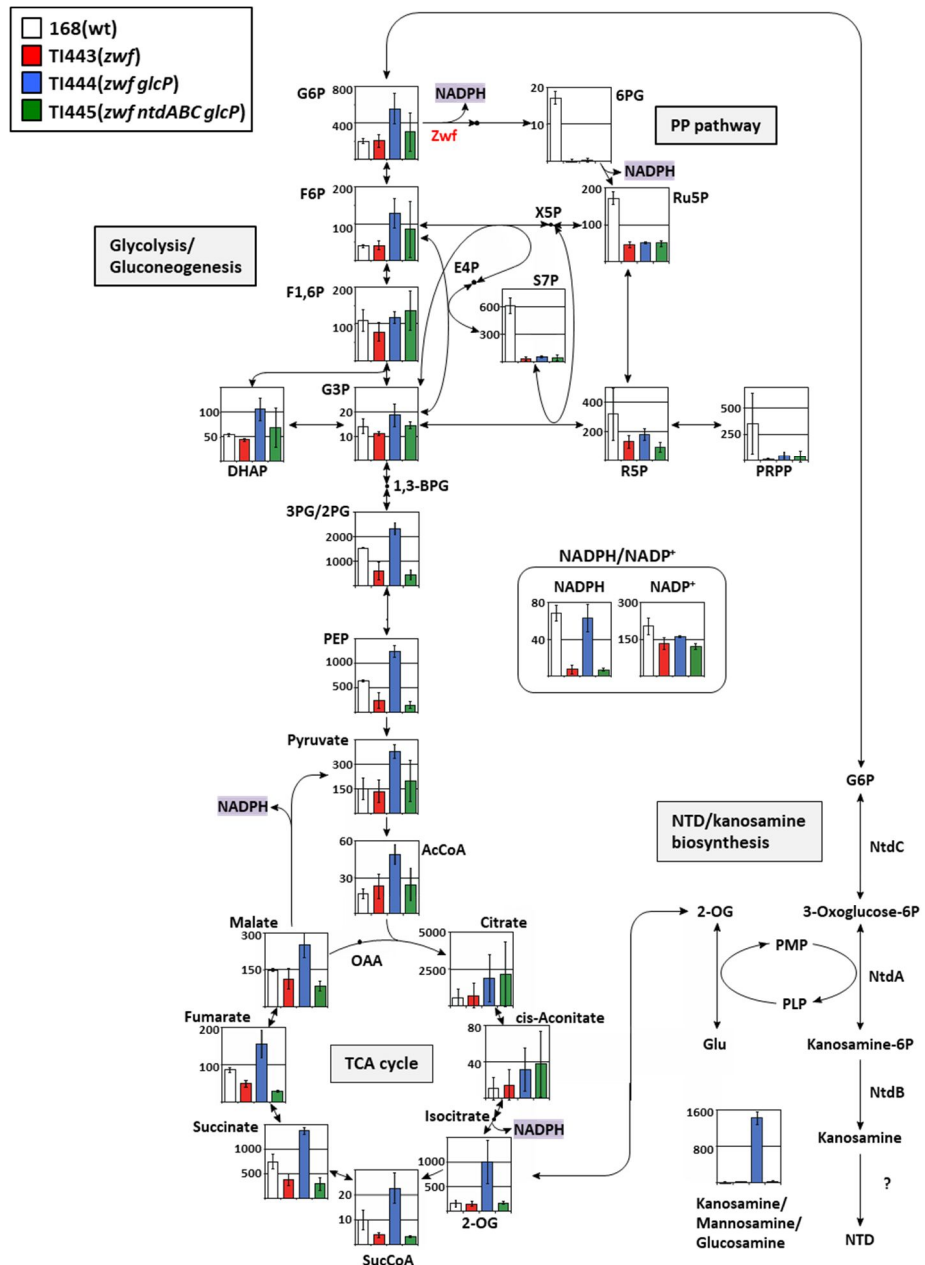


図3 メタボローム解析

(4) Zwf 欠損株におけるリンゴ酸の添加効果

メタローム解析の結果、リンゴ酸の蓄積が細胞内 NADPH の増加に寄与している可能性がある。そこで Zwf 欠損株におけるリンゴ酸の添加効果を検証した(図4)。予想した通り、リンゴ酸の添加により Zwf 欠損株の増殖が回復することがわかった(図4A)。さらに、リンゴ酸を添加した培地で生育させた Zwf 欠損株では細胞内 NADPH も約 2 倍増大していた(図4B)。

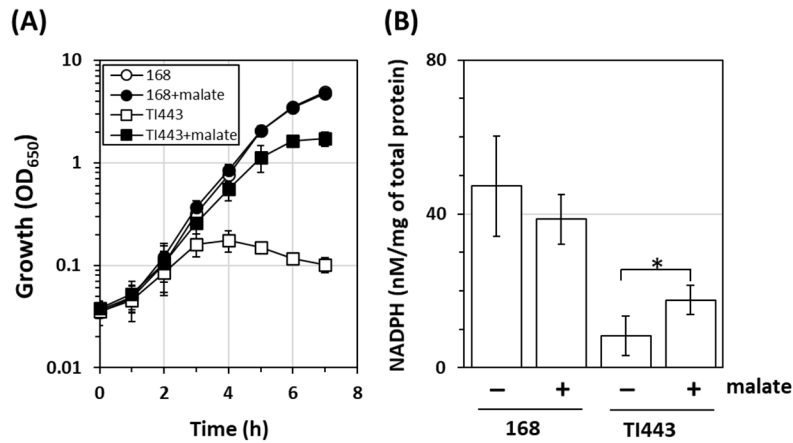


図4 Zwf 欠損株におけるリンゴ酸の効果

(5) NTD/カナサミン生合成と細胞内 NADPH 量との相関性

NTD/カナサミン生合成経路の活性化が細胞内 NADPH 量を増加させることが示唆されたことから、NTD/カナサミン生合成遺伝子の発現を *glcP* 遺伝子発現量でコントロールできる株 (TI480) を構築した(図5A)。この株では、*glcP* 遺伝子の発現は、IPTG で誘導可能な *spac* プロモーターからの転写が T_{ntdABC} をリードスルーすることによって起こる。*glcP* の発現増大は NTD/カナサミン生合成遺伝子の発現を抑制することになる。予想通り、TI480 株の増殖は IPTG の添加によって阻害され(図5B)、NTD/カナサミン生合成遺伝子の発現も抑制された(図5C)。また、細胞内 NADPH 量も IPTG 濃度に依存して低下したことから(図5D)、NTD/カナサミン生合成経路の活性化が細胞内 NADPH 量を増加させることが明らかとなった。

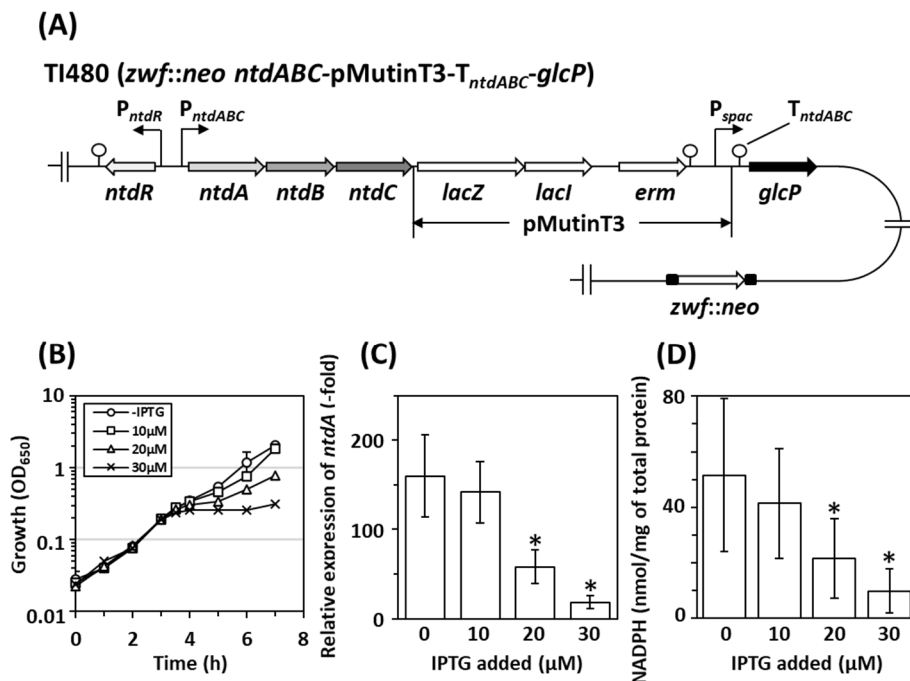


図5 細胞内 NADPH プールにおける NTD/カナサミン生合成の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Natsumi Saito, Huong Minh Nguyen, Takashi Inaoka	4. 巻 203
2. 論文標題 Impact of Activation of the Neotrehalosdiamine/Kanosamine Biosynthetic Pathway on the Metabolism of <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00603-20	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲岡隆史、斎藤菜摘、Nguyen Minh Huong
2. 発表標題 枯草菌のオートインデューサーNTDによる中心代謝制御
3. 学会等名 令和元年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲岡隆史、斎藤菜摘、Nguyen Minh Huong
2. 発表標題 枯草菌のオートインデューサー・ネオトレハロサジアミン過剰生産による代謝調節
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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