

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22267

研究課題名(和文) "グルコース資化のホモキラリティー" への挑戦! ~L-グルコース代謝の進化的検討~

研究課題名(英文) A challenge to homochirality in glucose catabolism----evolutional analysis in L-glucose catabolism

研究代表者

中村 顕 (Nakamura, Akira)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10207863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：最初にL-グルコース代謝の普遍性を検討するため、既知のL-グルコース資化菌の多くが属するRhizobiales目の基準株、148株を調べたところ、Mesorhizobium acaciae JCM 30534T株のみが明確なL-グルコース資化能を示した。この結果からL-グルコース資化能は株レベルの形質であると推察された。次に既分離株とは門レベルで異なるLuteolibacter LG18株のL-グルコース代謝機構を解析し、既知のP. laeviglucosivoransのものと比較した。その結果、LG18株の代謝経路では途中段階でC-4 epimerizationが必要なが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上のほとんどの生物はD-グルコースを資化することができるが、その鏡像体のL-グルコースを資化する生物は、長い間ないとされてきた。研究代表者は以前に自然界からL-グルコース資化菌P. laeviglucosivorans 43P株を単離し、その代謝機構を明らかにした。本研究では、43P株とは分類学上の門レベルで異なるLuteolibacter LG18株のL-グルコース代謝機構を解析したものであり、43P株とは部分的に異なる代謝機構を有していることを示唆する結果を得た。これらの結果は、生物の糖代謝、特に希少糖代謝に関して学術的に重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study we first analyzed the ability to utilize L-glucose in the type strains in the order Rhizobiales. Among 148 strains assayed, only Mesorhizobium acaciae JCM 30534T could utilize L-glucose, suggesting that the L-glucose utilization is not a common trait in this taxon.

Next, we analyzed the L-glucose-catabolic pathway in Luteolibacter sp. LG18, which belongs to different taxon at the phylum level from the known L-glucose utilizers. We identified a gene cluster of six genes in the LG18 genome, whose enzyme activities resemble in those of the L-glucose catabolic pathway in P. laeviglucosivorans 43P. However, precise enzymatic analyses of these genes suggested that the pathway in strain LG18 is different from that of strain 43P in part, including a C-4 epimerization, the enzyme of which is encoded by a gene outside of the cluster. Also, this gene cluster may have a function to utilize L-galactose.

研究分野：応用微生物学

キーワード：L-glucose catabolism Rhizobiales Verrucomicrobia Luteolibacter L-galactose

1. 研究開始当初の背景

地球上のほぼ全ての生命は、D-グルコースを代謝し炭素源・エネルギー源として利用できるのに対して、その鏡像異性体である L-グルコースを代謝可能な生命は存在しないと長年考えられてきた。すなわち【グルコース代謝にはホモキラリティーが存在する】とされてきた。ところが、糖類が生命誕生以前に純粋な化学反応により生じたとする化学進化説に従えば、太古の地球には L-グルコースが存在した可能性が十分考えられるので、「L-グルコースを資化可能な古生命が存在していた」としても不思議ではない。この推定が正しいとすれば、現在の地球上に L-グルコース資化能を有する生命が存在し、その特性は古生命の子孫にあたる分類群(おそらく細菌の一部)に保存されている可能性が考えられる。また、解糖系やペントースリン酸経路などの D-グルコース代謝経路が生物間で保存されているのと同様に、L-グルコース代謝機構も進化的に保存されている可能性も考えられる。

研究代表者は、「グルコース資化のホモキラリティー」への挑戦として、L-グルコース資化菌

Paracoccus laeviglucoosivorans 43P 株を自然界から分離し、その L-グルコース代謝機構を酵素・遺伝子レベルで明らかにした(図 1)。また、43P 株とは異なる 4 属に属する L-グルコース資化菌の分離に成功(未発表)していたが、これらの株は全て *Alphaproteobacteria* 綱に属する細菌であった。従って L-グルコース資化能は少なくとも *Alphaproteobacteria* 綱の一部で保存されている可能性があるかと推定していた。ところが最近改めて自然界から L-グルコース資化菌をスクリーニングしたところ、16S rRNA 遺伝子配列から *Luteolibacter* 属に属する菌株(LG18 株)が分離された。*Luteolibacter* 属は *Verrucomicrobia* 門に属しているため、LG18 株は既に分離した L-グルコース資化菌(既分離株)とは門レベルで異なることになる。このことから、L-グルコース資化能は細菌界では想定していた以上に広範な分類群で保存されている(L-グルコース資化能の普遍性)可能性が示された。また、LG18 株の代謝機構を明らかにして 43P 株のものと比較することにより、L-グルコース代謝機構が進化的に保存された特性なのかどうか(L-グルコース代謝機構の保存性)について重要な情報が得られると考えられる。

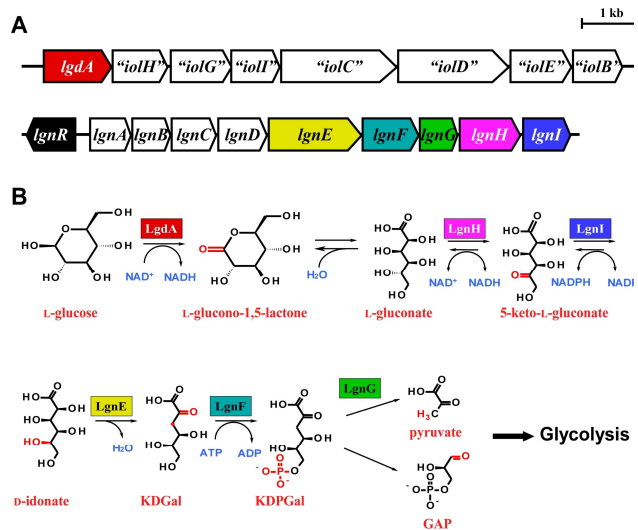


図 1 *P. laeviglucoosivorans* 43P 株の L-glucose 代謝経路

A, 代謝酵素の遺伝子配置

B, L-glucose 代謝経路

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、以下の 2 つの課題を設定して検討を加えることにより、L-グルコース代謝に対して進化の観点からメスを入れることを目的とした。

(1) L-グルコース資化能の普遍性の検討

既知菌株の L-グルコース資化能を検討することにより、L-グルコース資化能がどの程度の範囲の微生物群で保存されているのかを明らかにする。

(2) L-グルコース代謝機構の保存性の検討

LG18 株の L-グルコース代謝機構を解析する。この結果を既に明らかにした 43P 株の代謝機構と比較することにより、L-グルコース代謝機構が保存されているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) L-グルコース資化能の普遍性の検討

理研 JCM より、既分離株の大部分が含まれる *Alphaproteobacteria* 綱 *Rhizobiales* 目細菌の基準

株を取り寄せ、L-グルコース最少培地での生育を指標にL-グルコース資化能の有無を検討した。

(2) L-グルコース代謝機構の保存性の検討

LG18 株の細胞抽出液から L-グルコース代謝に関与する初発酵素及び第 2 段階酵素を精製し、その N 末端アミノ酸配列を決定した。この配列を、MiSeq を用いて決定した LG18 株のドラフトゲノム配列と照合することにより、該当する遺伝子を同定した。次に同定した遺伝子を大腸菌 pET system を用いて発現・酵素精製し、基質特異性を中心に酵素学的性質を検討した。また、周辺遺伝子が糖質代謝に関わる可能性が考えられたので、これらの遺伝子についても大腸菌を用いて発現・酵素精製し、その酵素学的性質について検討した。

(3) LG18 株の完全ゲノム配列の決定

前述の MiSeq による short read に加えて、GridION による long read を行い、hybrid assemble を行うことにより、LG18 株の完全ゲノム配列を決定した。

4. 研究成果

(1) L-グルコース資化能の普遍性の検討

理研 JCM より *Rhizobiales* 目の各属・種の基準株、計 148 株を取り寄せ、L-グルコース最少液体培地での生育を指標に L-グルコース資化能を検討した。その際に炭素源なしの培地及び D-グルコース添加培地を、それぞれ negative, positive control として用いた。また、43P 株及び大腸菌 W3110 株を、L-グルコース資化能の positive, negative control とした。

その結果、*Mesorhizobium acaciae* JCM 30534^T 株のみが L-グルコース最少培地で明確に生育し、L-グルコース資化能を有していることが判明した。既分離株の中には *Mesorhizobium* 属に属すると考えられる細菌が含まれているが、今回検討した 11 株の *Mesorhizobium* 属細菌のうちで同株のみが L-グルコース資化能を有していることになる。また 16S rRNA 遺伝子配列の相同性から、既分離株と同種と推定される基準種も L-グルコース資化能を示さなかった。このことから、L-グルコース資化能は属・種のような分類体系で保存された形質ではなく、むしろ株レベルで異なる形質である可能性が考えられた。

なお、この検討は当初徐々に検討範囲を広げていく予定であったが、この結果を受けて他の分類群の検討は行わないこととした。

(2) L-グルコース代謝機構の保存性の検討

LG18 株の代謝初発酵素の同定と精製

最初に LG18 株の L-グルコース代謝における初発酵素反応を同定するために、同株の細胞抽出液を用いて、一般的な糖代謝の初段階反応(リン酸化、異性化、酸化)の反応の検出を試みたところ、NAD⁺依存的な dehydrogenase 活性のみが検出された。そこで同酵素活性を指標に L-glucose dehydrogenase (L-GDH) を精製した。精製酵素は約 37 kDa の分子量で、これを用いて N 末端アミノ酸配列を決定した。また、後述する組換え酵素を用いた酵素反応の検討により、反応産物は L-gluconate であることが判明した。

代謝第 2 段階酵素の精製

初段階酵素の反応産物が L-gluconate であったので、再び LG18 株の細胞抽出液を用いて L-gluconate に対する酵素活性の検出を行ったところ、NAD⁺依存的な dehydrogenase 活性が検出された。そこで同酵素(L-gluconate dehydrogenase; L-GnDH)を精製し、その N 末端アミノ酸配列を決定した。

推定 L-グルコース代謝遺伝子クラスターの同定

上記で得られた L-GDH, L-GnDH の N 末端アミノ酸配列を、別途 LG18 株ゲノムを MiSeq を用いた short read 解析により得られたドラフトゲノム配列と照合し、両酵素をコードする遺伝子を同定した。両遺伝子は LG18 株ゲノム上近接して存在し、6 遺伝子からなるクラスター内に位置していることが明らかになった(図 2)。この遺伝子クラスターの残る 4 遺伝子は、annotation からは酵素活性レベルで 43P 株の L-グルコース代謝経路と合致するものであった。そのため、この遺伝子クラスターがコードする酵素群により L-グルコース代謝が行われるものと仮定して、各遺伝子を大腸菌 pET system により発現・酵素精製し、酵素レベルで機能解析を行うこととした。

組換え酵素を用いた機能解析

・ 4340 (L-GDH)

本酵素は 43P 株の該当する酵素(LgdA)とは protein family が異なり、相同性も 18%と低いものであった。この酵素はL-グルコース以外に、その C-4 epimer である L-ガラクトースに対しても活性を示し、反応速度論的解析から L-ガラクトースの方が好適な基質であった。L-グルコースからの反応産物は、LC/MS、旋光度計を備えた HPLC により L-gluconate であることが明らかになった。

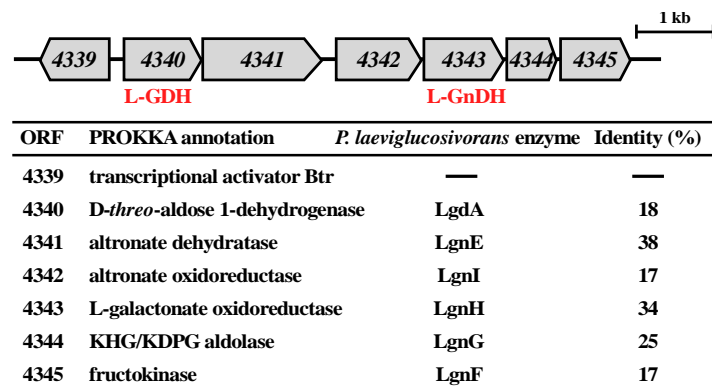


図 2. LG18 株の推定 L-glc 代謝遺伝子クラスターと annotation

・ 4343 (L-GnDH)

本酵素は 43P 株の該当する酵素(LgnH)と同じ protein family に属するものの、相同性は 34%とそれほど高いものではなかった。この酵素は、L-GDH の反応産物である L-gluconate を基質とする以外に、L-ガラクトースを基質とした場合の 4340 酵素の反応産物と推定される L-galactonate に対しても活性を示した。反応速度論的解析からは、どちらの基質も同程度の効率で反応を触媒した。L-gluconate からの反応産物は 5-keto-L-gluconate であった。

・ 4342

本酵素は 43P 株の該当する酵素(LgnI)とは異なる protein family に属し、相同性も 17%と非常に低いものであった。この酵素は D-altronate oxidoreductase と annotate されており、annotation 通り NADP⁺ (NADPH) 依存的な酸化還元反応による D-tagaturonate (5-keto-L-galactonate) と D-altronate 間の変換反応を触媒した。ところが LgnI が持つ 5-keto-L-gluconate と D-idonate 間の変換活性については、いずれの化合物を基質とした場合にも 1/20 以下の非常に低い活性しか示さなかった。そのため本酵素の native な基質は、4343 酵素の L-galactonate からの反応産物である D-tagaturonate (5-keto-L-galactonate)であると結論した。

・ 4341

本酵素は 43P 株の該当する酵素(LgnE)と同じ protein family に属し、相同性も 38%とやや高い値を示したが、本酵素は LgnE の基質である D-idonate に対しては活性を示さず、4342 の反応産物である D-altronate に対してのみ活性を示した。本酵素の反応産物は 2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG)であった。

・ 4345

本酵素は fructokinase と annotate されており、実際に D-fructose を基質として 6 位をリン酸化する活性が検出された。本酵素は 4341 の反応産物である KDG、LgnE の反応産物である 2-keto-3-deoxy-D-galactonate (KDGal)に対しては全く活性を示さなかった。そのため本遺伝子は、この代謝経路と直接関連しないものと考えられる。

・ 4344

本酵素は 43P 株の該当する酵素(LgnG)と同じ protein family に属するが、その相同性は 25%と、それほど高いものではなかった。また KHG/KDOG aldolase と annotate されており、実際に KDG-phosphate を基質として pyruvate 及び D-glyceraldehyde-3-phosphate を生じる活性を示した。それに対して 43P 株の該当する酵素(LgnG)の基質である KDGal-phosphate に対しては全く活性を示さなかった。

以上の結果より、本遺伝子クラスターは L-ガラクトース代謝にも関与することが強く示唆された。また、この遺伝子クラスターが L-グルコース代謝に関与する場合、代謝第 3 段階で 5-keto-L-gluconate を 5-keto-L-galactonate (D-tagaturonate)へと変換する C-4 epimerase が必要であることが推定された。この酵素をコードする遺伝子はクラスター内には存在しないが、LG18 株ゲノム中に 3 つの候補遺伝子(0966, 2377, 3824)が見出されている。また、4345 が KDG に対して活性を示さなかったが、LG18 株ゲノム中に KDG kinase と annotate されている遺伝子として、4314 を見出したので、同遺伝子が関与する可能性が考えられる。

今後は C-4 epimerase、KDG kinase の酵素・遺伝子の同定、及び各遺伝子の破壊株作製を通じて、同定した遺伝子が L-グルコース/L-ガラクトース代謝に関与するかどうかを検討する予定である。

(3) LG18 株の完全ゲノム配列の決定

Luteolibacter 属は 2008 年に提唱された比較的新しい属である。同属の細菌は比較的難培養性であり、分離例は少ない。そのため、同属のゲノム配列は *L. luteus* G-1-1-1 株しか報告例がない。また、LG18 株はその 16S rRNA 遺伝子配列から、同属の新種である可能性が考えられる。このような状況から、前述の MiSeq による short read に加えて GridION による long read を行い、hybrid assemble を行うことにより、LG18 の完全ゲノム配列を決定した。その結果、LG18 株ゲノムは全長約 5.80 Mb の単一の環状 DNA から構成されていることが判明した。*L. luteus* ゲノムと比較すると、全長(約 6.41 Mb)はやや短く、それに伴って CDS もやや少ない(4,598 vs 5,347)ことが明らかになった。

今後は LG18 株の生理・生化学的解析を行い、*Luteolibacter* 属の新種としての記載を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 谷内田優史、中村顕
2. 発表標題 新規L-glucose資化細菌Luteolibacter sp. LG18株のL-glucose代謝機構の解析
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷内田優史、中村顕
2. 発表標題 新規L-glucose資化細菌Luteolibacter sp. LG18株のL-glucose代謝機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2020年度大会
4. 発表年 2020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
---------	---------