

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22573

研究課題名（和文）乳酸菌ライブラリの情報整備と活用に向けた糖代謝-機能性相関解析

研究課題名（英文）Correlational analysis of the glycometabolism and functionalities of probiotic lactic acid bacteria.

研究代表者

須志田 浩稔（Sushida, Hirotochi）

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・研究員

研究者番号：10885510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：炭素源依存的なムチン付着性を示す *Lactococcus cremoris* 7-1株の全ゲノム配列を解読後、5種類の糖をそれぞれ主炭素源とする培養条件でRNA-seq解析を実施し、ムチン付着性と発現量とで正の相関を示す16のムチン付着性因子候補を同定した。本菌株は染色体上に既知のアドヘシンEF-TuとGAPDHをコードしているが、これらの発現変動は確認されておらず、付着性変動の主要因ではないと予想された。16の候補遺伝子からはアドヘシン様ドメインを持つ機能未知タンパク質が見出されており、本タンパク質とその生産制御が付着性変動に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムチン付着性は腸管上皮に対する微生物の定着性に関与しており、プロバイオティクスとして機能性乳酸菌を選抜する上で重要な指標となる。本研究ではプロバイオティクス候補乳酸菌における炭素源別の遺伝子発現プロファイルを明らかにし、細胞凝集等を介したムチン付着性への関与が推定される機能未知タンパク質を同定した。これらは微生物-宿主間の新たな分子的相互作用の存在を示唆するものであると同時に、プロバイオティクス菌株の選抜マーカーとしての利用も期待されることから、産業的な乳酸菌利用の更なる加速を目指す上での基盤的情報となるものである。

研究成果の概要（英文）：Transcriptomic analysis of *Lactococcus cremoris* strain 7-1 independently cultured with five carbon sources revealed that 16 Differential Expressed Genes (DEGs) showed correlation between expression levels and mucin binding abilities. Whole genomic sequencing demonstrated that strain 7-1 harbored the genes coding previously described adhesins EF-Tu and GAPDH, whereas they were not included in DEGs detected in this research. On the basis of hypothesis that sugar-dependent properties of strain 7-1 are mainly regulated by the expression of specific gene, detailed functions of 16 DEGs were predicted by using various tools including SignalP, TMHMM, and InterProScan since the almost of them had been annotated as hypothetical proteins. A predicted adhesin-like protein, which involves domain of unknown function, has been supposed to be integrated in variable mucin-binding ability of strain 7-1 via carbohydrate metabolism-dependent transcriptional regulation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 プロバイオティクス バイオインフォマティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト腸管内の微生物群集：腸内フローラが宿主たるヒトに及ぼす影響が注目されている。抗生物質の代替として有用微生物を用いた腸内フローラへの干渉は 1980 年代から提唱されており、これはプロバイオティクスと定義される。プロバイオティクスの代表例である乳酸菌を用いた腸内環境の改善においては、腸管上皮の粘膜成分である糖タンパク質：ムチンへの付着性が乳酸菌の定着を促進する主要因として報告されている。ムチンはコアとなるタンパク質に高密度の糖鎖が結合した高分子タンパク質の総称である。腸内フローラ内には糖鎖分解酵素を持つ微生物種も多いが、ムチンへの付着性についてこれらの酵素は関与しないと考えられており、Mucus-binding protein：MucBP と呼ばれる細胞表層タンパク質が主要な因子として機能する。

Lactococcus cremoris 7-1 株は、モンゴルの家庭(ゲル)で作られたバター様の乳製品である Urum から単離された乳酸菌であり、プロバイオティクス乳酸菌 *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG 株と同等のムチン付着性を示すことから、食経験に基づく安全性を背景としてプロバイオティクスの有望候補とされている。一方で、7-1 株では培地中の主炭素源(糖)に依存したムチン付着性傾向が観察されているものの、本菌株が持つムチン付着性因子と生産制御機構の詳細は未解明である。

2. 研究の目的

Lactococcus cremoris 7-1 株の炭素源依存的なムチン付着性とその制御メカニズムに関する知見は、多様な糖成分を含む発酵食品原料に対するプロバイオティクス乳酸菌の親和性、およびプロバイオティクス菌体の培養・調製に際する機能性増進を検討する上で、重要な情報基盤になることが期待される。

そこで本研究では、*L. cremoris* 7-1 株のムチン付着性とその糖代謝依存的な制御機構の解明を目的とする。同時に、期待される成果であるムチン付着性因子と生産制御機構の各遺伝子配列を対象とした乳酸菌選抜マーカーの利用可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌 *L. cremoris* 7-1 株の全ゲノム配列を決定するため、所属機関で得られていた PacBio RS II によるロングリードシーケンスデータのアセンブルを実施し、DFAST によるアノテーションを行った。また、本菌株の形質に着目した情報整理として Pfam を利用したタンパク質機能予測を実施し、既知のプロバイオティクス菌株との比較を行った。

(2) ムチン付着性の変動が報告された下記の培養条件において、網羅的な遺伝子発現解析を実施した。5.0 g/L の glucose, fructose, lactose, galactose, xylose をそれぞれ主炭素源とする改変 MSR 液体培地で 7-1 株を培養後、DNBSEQ-G400RS による RNA-seq を実施した。以下、下線は使用したツールを示す。全ゲノム配列へのマッピング(Hisat2)のちリードカウント(FeatureCount)を行い、発現変動遺伝子(Differential Expressed Genes: DEGs)を検出した(R)。一般にムチン付着性因子は膜貫通タンパク質、あるいは分泌型タンパク質として細胞表層に局在すると考えられていることから、各 DEGs がコードするタンパク質について分泌シグナル(SignalP)、膜貫通領域(TMHMM)の有無を予測し、同時に機能ドメインの追加探索(InterProScan)を行った。

4 . 研究成果

(1) *Lactococcus cremoris* 7-1 株の全ゲノム解析

解析の結果、染色体 (2,557,589 bp; GC content: 35.7%)と2つのプラスミド pLC71A/B (98,383 bp/31,483 bp; GC content: 35.4%/34.9%)を同定した。アセンブル後の各配列と PacBio RS II の出力データは DDBJ へ登録済みである (Accession number: AP025520 (chromosome), AP025521/AP025522 (pLC71A/B); DDBJ Sequence Read Archive accession number: DRA013132)。染色体配列は *L. cremoris* MG1363 株 (NCBI Reference Sequence: NC_009004.1)に高い相同性 (query cover, 89%; identities, 99%)を示した一方、プラスミド pLC71A および pLC71B の相同配列はそれぞれ *L. lactis* DPC3147 株のプラスミド pMRC01 (GenBank accession number AE001272; query cover, 33%; identities, 99.66%)、*Streptococcus parauberis* SPOF3K 株の染色体 (GenBank accession number CP025420; query cover, 33%; identities, 98.45%)となった。

DFAST でのアノテーションにより、7-1 株の染色体上からは既知のアドヘシンである EF-Tu と GAPDH が同定された。また、全ゲノム中にコードされる 2718 タンパク質の Pfam 検索により、ムチン付着 (MucBP)、細胞外マトリックス結合 (LysM)、フィブロネクチン結合 (Fbp) 等のアドヘシン様ドメインを有する 26 のタンパク質が見出された。既知のプロバイオティクス 8 属 13 種 15 菌株で同様の解析を行なった結果、属レベルでアドヘシン様ドメインの保持数に偏りが見られたのに対し、7-1 株ではそれらの網羅的な分布が観察され、7-1 株のムチン付着性変動に複数のアドヘシンが関与することが示唆された。

(2) RNA-seq データに基づくムチン付着性因子の探索

全ゲノム解析により複数のアドヘシン様タンパク質が見出されたものの、炭素源依存的なムチン付着性変動との関連は未解明であり、ゲノム中に新奇のムチン付着性因子が存在することも予想される。そこで、付着性変動と発現量との相関を示す遺伝子の探索を開始点として、7-1 株の主たるムチン付着性因子の同定を試みた。

解析の結果、7-1 株がコードする 2805 遺伝子中 146 遺伝子で有意な発現変動が検出され、そのうち炭素源別の発現量とムチン付着性との間で正の相関が観察された 16 の DEGs を候補とした。一方、7-1 株の EF-Tu、GAPDH、および Pfam ドメイン解析で予測された 26 のアドヘシン様タンパク質をコードする各遺伝子については本試験系における発現変動の相関は確認されなかった。16 の候補 DEGs がコードするタンパク質は 9 つが膜貫通型、うち 1 つが分泌シグナルを持つと推測され、InterProScan による機能予測では transporter と permease が多数を占めた。特筆すべき候補として、アドヘシン様の機能未知ドメインを含むタンパク質、およびこれに隣接する膜タンパク質が検出されており、同一プロモーターによる糖代謝依存的な発現制御を受けている可能性が示唆された (未発表のため、配列等の詳細は記載しない)。

本研究では、7-1 株のゲノム中で糖代謝非依存的な発現制御を受けると推測される 26 のアドヘシン様タンパク質を見出すと同時に、ムチン付着性と発現量との相関を示し付着性変動の主要因となるアドヘシン候補因子を推定した。今後、各遺伝子の異種発現株を構築し *in vitro* での機能検証を進めるとともに、引き続きプロバイオティクス選抜マーカーとしての利用可能性を探索する。

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 1件）

1. 著者名 Sushida Hirotooshi, Sakai Hiroaki, Moriya Naoko, Nakano Kazuma, Ashimine Noriko, Minami Maiko, Tamotsu Hinako, Nakanishi Tetsuhiro, Ohki Shun, Teruya Kuniko, Hirano Takashi, Yamasaki Seishi, Suzuki Chise, Satou Kazuhito, Kimoto-Nira Hiromi	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Lactococcus cremoris Strain 7-1, a Lactic Acid Bacterium Isolated from a Traditional Mongolian Milk Product Possessing Mucin-Adhesive Ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	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/mra.00143-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須志田浩稔、山崎正史、木元広実
2. 発表標題 Lactococcus cremoris 7-1株の炭素源依存的なムチン付着性に関するin silico解析
3. 学会等名 2022年度日本乳酸菌学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------