

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26506012

研究課題名(和文) Dアミノ酸でよりよく成長する微生物の系統と代謝

研究課題名(英文) Phylogeny and metabolism of microorganisms that grow better with D-amino acids

研究代表者

長沼 毅 (Naganuma, Takeshi)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：70263738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物はふつうLアミノ酸を用いるが、本研究ではDアミノ酸の中でもDグルタミン酸だけでよりよく生育する微生物を環境から新たに分離し、その特異な生育に関わる遺伝子発現を定量した。環境分離菌はラオウルテラ・オルニチノリティカ種に分類され、その種の標準株もまたDグルタミン酸だけでよりよく生育することが新たにわかった。これらの生育ではDアミノ酸脱水素酵素(DAD)の遺伝子が最も顕著に発現していた。DADを使う利点として、Dアミノ酸からワンステップで有用な、ケト酸を生じること、そして、他の関連酵素と比べて、使える酸化剤(電子受容体)の種類が多い上に有害な過酸化水素を生じないことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dアミノ酸でよりよく生育する生物は、他の研究グループが深海底から発見したDバリン資化菌が世界初の論文(2016)であり、本研究計画時(2013)に発見したDアミノ酸資化菌を本研究により詳細に研究した論文(2018)が世界2例目である。Dバリン資化菌は主にゲノム解析が行われたのに対し、本研究では「Dアミノ酸でよりよく生育」する際の遺伝子発現の定量を行い、それまで想定されていたラセマーゼ経路ではなく、Dアミノ酸脱水素酵素を経由する代謝系の重要性を指摘した点に学術的意義がある。これにより、近年になって芽生えてきたDアミノ酸バイオテクノロジーとその利用に基礎的な知見をもたらした点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：A microorganism that grows better with D-glutamate as a sole organic nutrient was isolated from environment, against the general view of life primarily and mainly depending on L-amino acids, and was affiliated with Raoultella ornithinolytica. During the D-glutamate-based cultures of the isolated environmental strain and the standard strain of the species obtained from a culture collection, enhanced gene expressions of the enzyme D-amino acid dehydrogenase (DAD) were observed particularly in the late log-phase of their growth stages. The gene of the enzyme racemase, which had been expected to be most enhanced, was not enhanced. As possible metabolic advantages of the DAD enzyme, one-step production of useful α -keto acids from D-glutamate and, compared with the other relevantly involved enzymes, a wider range of oxidants availability and non-generation of harmful H₂O₂ are considered

研究分野：簿生物生態学

キーワード：Dアミノ酸 微生物 ラオウルテラ・オルニチノリティカ 遺伝子発現 Dアミノ酸脱水素酵素 ラセマーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D アミノ酸は生物体ではほとんど使われていないが、さまざまな自然環境、たとえば土壌、河川、湖沼、海洋、雪氷、エアロゾル、降水などに存在することが知られている。環境中の D アミノ酸は、生物体の続成作用におけるラセミ化で生じた、あるいは、細菌細胞壁から遊離したものと考えられている。L アミノ酸に比べて D アミノ酸は微生物による分解・吸収を受けにくいので、生体試料より環境試料において D/L 比が高くなる傾向がある。一方で、本研究で示すように、D アミノ酸を有機物源として利用(資化)する微生物も確かに存在する。

微生物による D アミノ酸資化はおもに土壌で研究されてきたし、土壌微生物ではふつうの現象であると考えられている。海洋でも微生物による D アミノ酸資化は調べられているが、D アミノ酸資化菌の分離例はほんの少ししかない。2012 年に南シナ海の水深 2000 m の海底堆積物から分離された D アミノ酸資化菌 *Phaeobacter* sp. JL2886 は全ゲノム解析が行われた。日本の相模湾の水深 800 - 1500 m の海底堆積物 56 試料から 28 株の D アミノ酸資化菌が分離され、そのうちのひとつ *Nautella* sp. A04V は L パリンより D パリンでよりよく生育することが示されたが、その代謝についてはまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

上述の先行研究とは別に、われわれも独自に D アミノ酸を唯一の有機物源とし、かつ、D アミノ酸でよりよく生育する微生物を探索してきた。その結果、D グルタミン酸でよりよく生育する微生物“A25 株”を、日本国内のふつうの河川から新たに発見した。A25 株の分離源である河川水中の D グルタミン酸の濃度は測定していないが、一般的に河川水中の D グルタミン酸濃度は 10^{-5} – 10^{-4} mM であることが知られている。これは培養実験で設定される濃度 (10^0 – 10^1 mM) より低濃度である。

A25 株の 16S rRNA 遺伝子配列をほぼ全長にわたって調べたところ、*Raoultella ornithinolytica* の 16S rRNA 遺伝子配列と 100% 一致した。そこでわれわれは、*R. ornithinolytica* の標準株と、すでに D グルタミン酸を資化することが知られていた *Pseudomonas aeruginosa* の標準株を国内の系統保存施設から入手し、A25 株との比較をすることで、D グルタミン酸資化という特異な代謝の分子生物学的機構を探ることにした。

3. 研究の方法

われわれが環境から単離した A25 株が帰属する *R. ornithinolytica* 種の標準株と、すでに D グルタミン酸を資化することが知られていた *Pseudomonas aeruginosa* の標準株を国内の系統保存施設(理研 JCM)から入手し、A25 株との比較をした。

本研究では、D グルタミン酸資化という特異な代謝の分子生物学的機構を探る第一歩として、これら 3 株の D グルタミン酸代謝に関わる酵素の遺伝子発現について、逆転写定量 PCR 法 (RT-qPCR) で定量した。ターゲットにした酵素は以下の 4 つである：(1) D アミノ酸脱水素酵素 (DAD, 酵素コード EC 1.4.99.1; 遺伝名 *dadA*); (2) グルタミン酸ラセマーゼ (EC 5.1.1.3; *murI*); (3) D グルタミン酸酸化酵素 EC 1.4.3.7; *dao* ないし D グルタミン酸 (D アスパラギン酸) 酸化酵素 (EC 1.4.3.15; *dao*); (4) 細菌細胞壁ペプチド合成に関わる UDP-*N*-アセチル- α -D ムラモイル-L アラニル-D グルタミン酸リガーゼ (EC 6.3.2.9; *murD*)。

4. 研究成果

【結果概要】 用いた 3 株のすべてにおいて、D アミノ酸脱水素酵素 (DAD) の遺伝子 (*dadA*) が顕著に発現していること、しかし、*R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株と *P. aeruginosa* 標準株では、

dadA 遺伝子発現のタイミングがそれぞれ対数増殖期と定常期というように異なっていることがわかった。この差異が、*R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株が D グルタミン酸でよりよく生育すること、*P. aeruginosa* 標準株が L グルタミン酸でよりよく生育することの差異に関係するのか、今後のさらなる研究で明らかにされることが期待される。

【遺伝子発現の増大】D グルタミン酸代謝に関わる酵素としてターゲットとした 4 つの酵素の遺伝子と 16S rRNA 遺伝子の発現量を、D あるいは L グルタミン酸のどちらかで培養した *R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株 (JCM 6096^T) および *P. aeruginosa* 標準株 (JCM 5962^T) について、RT-qPCR 法で定量することができた (図 1)。

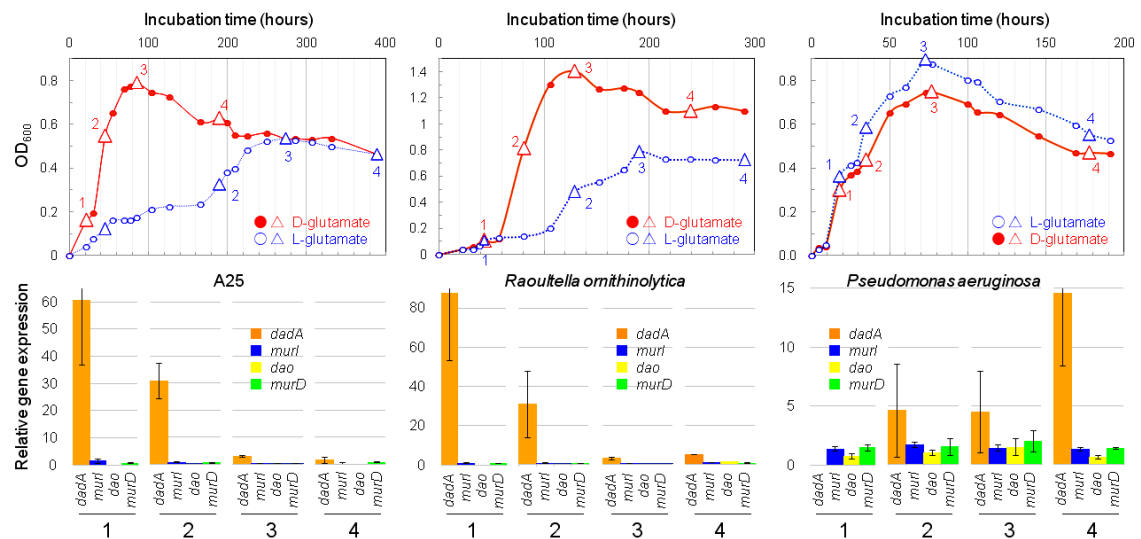


図 1. A25 株、*R. ornithinolytica* 標準株、*P. aeruginosa* 標準株の生育と遺伝子発現。

左から右へ、A25 株、*R. ornithinolytica* 標準株、*P. aeruginosa* 標準株の順で示してある。

上段：D グルタミン酸で培養したとき () と L グルタミン酸で培養したとき () の成長曲線と遺伝子発現を定量したタイミング (1~4)。

下段：成長曲線の 4 つのタイミング (1~4) で定量した 4 つのターゲット遺伝子 (*dadA*、*murI*、*dao*、*murD*) の発現量。

R. ornithinolytica A25 株 / 標準株および *P. aeruginosa* 標準株を D グルタミン酸で培養すると、*dadA* 遺伝子の発現量が顕著に増大した (図 1)。まず、A25 株と *R. ornithinolytica* 標準株では、成長曲線の対数増殖期初期 (図 1 のタイミング) において *dadA* 遺伝子発現量が顕著に増大し、その後、対数増殖期中期から定常期後期にかけて緩やかに減少していった。この対数増殖期初期の顕著な発現増大とその後の減少傾向には、何らかの抑制的機構、たとえばクオラムセンシング (細菌の細胞密度と遺伝子調節の関係) が作用した可能性が考えられる。

一方、*P. aeruginosa* 標準株では、*dadA* 遺伝子発現は対数増殖期中期から定常期にかけて増大し (図 1 のタイミング から) 定常期後期に最大になった (図 1 のタイミング)。 *R. ornithinolytica* の A25 株 / 標準株と *P. aeruginosa* 標準株とでは、クオラムセンシングのはたらきかたに差異があるように見える。それはあたかも *R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株にはネガティブに、*P. aeruginosa* 標準株にはポジティブに作用しているように見える。このようにクオラムセンシングが逆方向に作用することは他研究で理論的にも実験的にも示されている。*dadA* 遺伝子発現のタイミングや意義に差異があろうとも、これらの菌株の D

グルタミン酸代謝において、DAD 酵素が重要な役割を果たしていることははっきりしている。

DAD はフラビン酵素のひとつで、遊離した中性アミノ酸を α ケト酸 (2-オキソ酸) に酸化する反応を触媒する。この反応はエネルギー発生的な異化作用に至るものである。それ以外にも、*P. aeruginosa* における病原性因子の発現や細菌の種間コミュニケーションによる発現誘導に DAD 酵素ないし *dadA* 遺伝子が関わっている可能性がある。このように DAD の役割が多面的であるがために *dadA* 遺伝子発現増大の意義や理由をひとつに絞ることは難しいが、(単に異化的エネルギー発生だけでなく) DAD に多面的機能があることが *dadA* 発現増大に関係していることは十分に考えられる。

D グルタミン酸の代謝において、本研究では当初、ラセマーゼによる D グルタミン酸から L グルタミン酸への直接変換が主要な経路ではないかと想像していた。乳酸菌を用いた従前の研究もまた“ラセマーゼ・ファースト”の考え方を支持していた。一方、大腸菌やサルモネラ属菌を用いた研究からは DAD を介した間接変換 (D グルタミン酸から α ケト酸を経由して L グルタミン酸への関節変換) が主要経路であると報告されていた。さらに、D アルギニンの代謝とラセミ化において、2 つの脱水素酵素 (D アルギニン脱水素酵素と L アルギニン脱水素酵素) の共役が重要であることが、*P. aeruginosa* PAO1 株を用いた他グループの研究から報告された。本研究で用いた *R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株でも同様にダブル脱水素酵素 (D グルタミン酸脱水素酵素 (DAD) と L グルタミン酸脱水素酵素) の共役があるかもしれないが、それは本研究では調べていないので、今後の課題である。

D グルタミン酸に DAD が作用してできる α ケト酸は α ケトグルタル酸であり、これは後にクエン酸回路に入ってエネルギー代謝ならびに様々な生理的・生化学的過程に寄与することになる。D グルタミン酸から α ケトグルタル酸を生じるには、脱水素反応でも酸化反応でもよいし、もしかしたら上述のダブル脱水素酵素の共役もあるかもしれない。D グルタミン酸の代謝において、これらの反応はラセマーゼによるラセミ化 (直接変換) より重要かもしれない。実際、DAD の遺伝子 *dadA* の発現増大に比べて、ラセマーゼの遺伝子 *murI* の発現は見劣りするものだった。これは *R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株の D グルタミン酸代謝において DAD が介する α ケトグルタル酸のワンステップ生産の有用性を意味すると考えられる。 α ケトグルタル酸以外にも、DAD による α ケト酸のワンステップ生産は、バイオテクノロジー分野においても利用開発されている。

DAD による脱水素反応は、D アミノ酸酸化酵素 (DAO) による酸化反応に比べて有利な点がある。それはまず、DAO による酸化反応だと副産物として有害な過酸化水素 H_2O_2 が発生しかねないが、DAD は発生しない点である。また、DAO は酸化剤として分子状酸素 O_2 を必要とするが (それがために H_2O_2 を発生するのだが) DAD は必ずしも O_2 を必要とせず、多様な酸化剤を使って α ケトグルタル酸を (ワンステップで) 生産できることも有利な点として数えられるだろう。このように DAD にはいくつかの有利な点があることが、*R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株の、そして *P. aeruginosa* 標準株でも、D グルタミン酸代謝において DAD 経路が選ばれ、*dadA* の発現増大につながったことが考えられる。

【DAD 酵素活性の検出】 本研究では *dadA* 遺伝子発現の増大に加え、*dadA* がコードする酵素 DAD の活性もフェリシアナイド還元法により検出した (図 2)。フェリシアナイド還元活性は、D グルタミン酸で培養したときのみ検出され、L グルタミン酸で培養したときには検出されなかった。したがって、たとえ L グルタミン酸で培養したときに

dadA 遺伝子が発現していたとしてもその発現量は低レベルであり、DAD 酵素の存在や活性を検出できるほどではなかったと考えられる。逆にいうと、D グルタミン酸で培養したときは *dadA* の発現量が増大し、それが大量の DAD 酵素の生産につながって DAD 酵素活性も発揮されたことが想定できる。

R. ornithinolytica A25 株 / 標準株では、成長曲線の対数増殖期の初期から中期にかけて細胞重量あたりのフェリシアナイド還元活性 (DAD 活性) が比較的高かった (図 2)。このことは *R. ornithinolytica* A25 株 / 標準株の対数増殖期における *dadA* 発現量増大と関連しているのかもしれない。ただし、*P. aeruginosa* 標準株では必ずしも DAD 活性の高いタイミングと *dadA* 発現量増大のタイミングが整合的ではなかった。DAD 活性と *dadA* 発現の相互関係は今後の課題である。

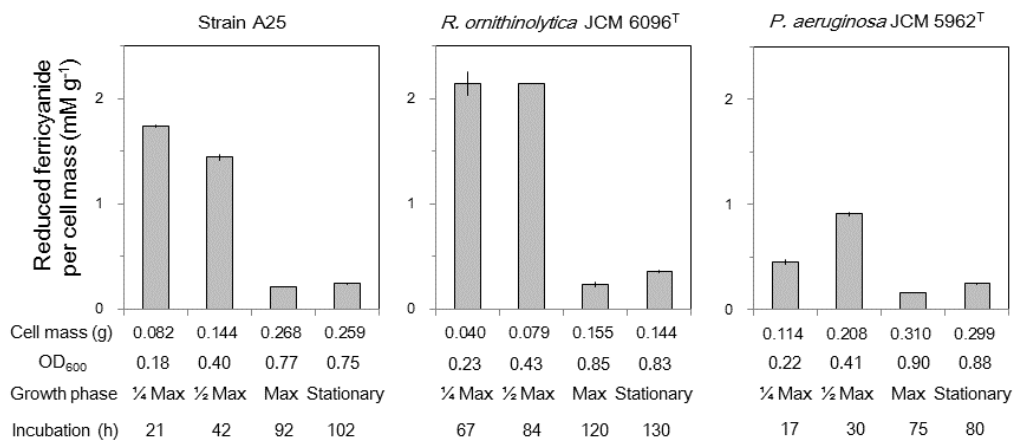


図 2. A25 株、*Raoultella ornithinolytica* 標準株、*Pseudomonas aeruginosa* 標準株の細胞抽出液におけるフェリシアナイド還元活性。D グルタミン酸が還元剤となって、フェリシアナイド $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ が $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ に還元されることで、D グルタミン酸脱水素酵素 (DAD) の存在を確認することができる。

【結論】 D グルタミン酸を唯一の有機物源として、L グルタミン酸よりよく生育する細菌 “A25 株” を世界で初めて分離した。アミノ酸全般でいえば、L バリンより D バリンでよりよく生育する細菌が先に報告されたが、D グルタミン酸資化菌としては本研究の A25 株が世界初である。A25 株は *Raoultella ornithinolytica* 種であることが判明し、この種の標準株 (JCM 6096^T) もまた D グルタミン酸でよりよく生育することが初めてわかった。これらの菌株が示す「D グルタミン酸でよりよい生育」には、成長曲線の対数増殖期初期における D グルタミン酸脱水素酵素 (DAD) の遺伝子 (*dadA*) の発現量の増大がともなっていることが、逆転写定量 PCR により明らかになった。D グルタミン酸を資化する (しかし L グルタミン酸でよりよく生育する) ことが知られていた *Pseudomonas aeruginosa* の標準株 (JCM 5962^T) を用いて同様の遺伝子発現定量を行ったところ、やはり *dadA* 遺伝子の発現量が増大していたが、そのタイミングは違って定常期であった。このタイミングの差異の意味や理由は、今後の課題である。*dadA* 遺伝子発現の帰結である DAD 酵素の存在はフェリシアナイド還元法により示され、遺伝子発現だけでなく実際の D グルタミン酸代謝においても DAD 酵素が機能していることが示唆された。他のターゲット酵素の遺伝子の発現量はあまり増大しなかった。これらの結果は、*R. ornithinolytica* の A25 株と標準株が D グルタミン酸を唯一の有機物源と

して生育するとき、DAD 酵素が中心的な役割を果たすことを示唆している。DAD 酵素は D グルタミン酸からワンステップで有用な α ケトグルタル酸をつくるが、有害な過酸化水素 H_2O_2 はつくらない、そして、D グルタミン酸の酸化に必ずしも酸素 O_2 を必要としない (O_2 があってもよい)。これらの特徴が、DAD が D グルタミン酸代謝の中心的役割を演じていることの原因かもしれない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeshi Naganuma, Yoshiakira Iinuma, Hitomi Nishiwaki, Ryota Murase, Kazuo Masaki & Ryosuke Nakai (2018-09-04) Enhanced bacterial growth and gene expression of D-amino acid dehydrogenase with D-glutamate as the sole carbon source. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2097. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02097 【査読あり】

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等： 特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者： なし

(2)研究協力者： なし

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、研究者個人に帰属されます。