

ジアシルグリセロール高蓄積納豆菌の創生

埼玉大学大学院 理工学研究科

松岡 聡

ジアシルグリセロール（DAG）は血中中性脂肪の上昇を抑える効果などが報告されており、昨今の健康志向の高まりに伴い注目されている。現在は、植物油から酵素法で作った DAG を食品に添加している。

グラム陽性菌モデル生物である枯草菌の脂質生合成経路について図 1 に示す。枯草菌は通常細胞膜にジアシルグリセロールを約 5%しか含まない⁽¹⁾が、ジアシルグリセロールキナーゼ遺伝子(*dgkB*)の発現抑制によって膜脂質の構成成分であるジアシルグリセロール(DAG)が蓄積する。この DAG の蓄積が膜タンパク質の膜への挿入が阻害されると考えられ、結果として致死となる。しかしながら、先行研究において、脂質生合成経路を改変（リポテイコ酸合成酵素遺伝子 *ltaS*・*dgkB* 二重欠損を作成）し、野生型の約 5 倍もの DAG を高蓄積する枯草菌の作製に成功した⁽²⁾。納豆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*)は分類学上枯草菌(*Bacillus subtilis*)と同種であるため、枯草菌での研究成果がそのまま適応できると期待される。しかしながら、同種に分類されているにも関わらず、枯草菌は納

豆を作れないなど、差異が見られるため、実証実験が必要とされる。そこで、DAG をより簡便に摂取できるようにすることを念頭に置いて、納豆菌に DAG を蓄積させることを目的した。

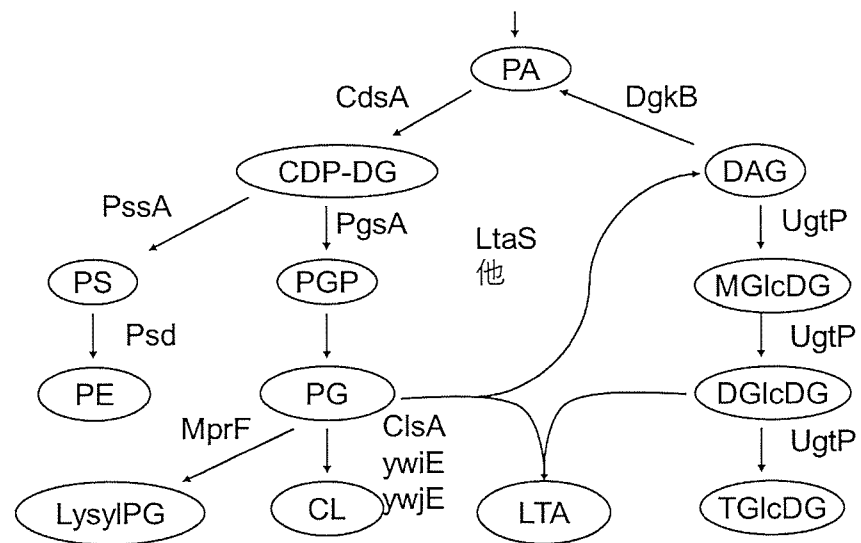


図 1 枯草菌脂質生合成経路

実験方法

1. 高形質転換能力の納豆菌を用いた遺伝子破壊納豆菌の作製

納豆菌は分類学上枯草菌と同種であるが、枯草菌と異なり形質転換能力が著しく低いいため、*mecA* を破壊することによって高い形質転換能力が付与された納豆菌である OK2 株⁽³⁾、SK2 株を使用して、既に作製済みの枯草菌遺伝子改変株から染色体 DNA を抽出し形質転換によって、納豆菌 *dgkB* 遺伝子をイソプロピル-β-ガラクト

シド(IPTG)で発現制御できるように改変、*ItaS* 遺伝子破壊を行った。

2. 遺伝子破壊納豆菌の諸性質の解析

2-1 生育測定

作製した納豆菌の遺伝子改変株の生育（液体培地、寒天培地）と脂質組成を解析した。培地には Lennox Broth (LB) 培地を用いた。寒天培地上の生育では、一晚培養した菌を生理食塩水で $10^0\sim 10^5$ に段階希釈したものを $2\ \mu\text{l}$ ずつ寒天培地上にスポットした。液体培地での生育では、一晚培養した前培養液を新たな培地に 1/100 希釈で植菌して、タイテック mini photo 518R(530 nm フィルター)により濁度を生育の指標として測定を行った。

2-2 脂質組成解析

（培養液量と菌濁度の積を）一定とした菌体から Bligh & Dyer 法⁽⁴⁾によって脂質抽出を行った。得られた脂質サンプルについて、TLC プレートにスポット後に展開溶媒（ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸 = 50:50:1）で脂質サンプル中の脂質を分離した。展開後に TLC プレートを乾燥させて溶媒を飛ばしてた。脂質と結合する蛍光試薬 プリムリンを噴霧し、紫外線照射によって脂質の可視化を行った。

結果と考察

1. 納豆菌遺伝子改変（破壊）株の作製

納豆菌は分類学上枯草菌と同種であるが、枯草菌の研究室基準株である 168 株と異なり形質転換能力が著しく低い。そこで納豆菌（枯草菌）の形質転換能力に必須である ComK の分解に係る *mecA* 遺伝子を破壊することで、形質転換能力の上昇した納豆菌（OK2 *mecA::spc*、SK2 *mecA::spc*）を親株として用いた。これらの納豆菌を受容菌として、枯草菌ジアシルグリセロールキナーゼ遺伝子 *dgkB* 発現制御株（ P_{spac} -*dgkB*, *erm^R*）、リポテイコ酸合成酵素遺伝子 *ItaS* 破壊株（*ItaS::erm^R*）の染色体 DNA を供与体として、形質転換を行った。結果として、高い形質転換頻度で目的の菌株（ P_{spac} -*dgkB*, *erm^R*, *ItaS::erm^R*）を取得することに成功した。

2. 遺伝子改変納豆菌の諸性質の解析

2-1 生育測定

作製した納豆菌遺伝子改変株について、寒天・液体培地での生育を解析した。OK2を親株とした一連の遺伝子改変納豆菌の生育を図2に示す。寒天培地上では、予想通り、*dgkB*発現制御(P_{spac} -*dgkB*)株において、*dgkB*発現を抑制すると生菌数が低下することが示された。また、生菌数の低下は*ItaS*の破壊によって*dgkB*発現に依存しなくなり、生菌数が親株と同様に回復することが示された(図2上段)。液体培地での生育では、寒天培地での生育ほど明瞭ではないが、個体培地での生育同様、*dgkB*発現抑制による生育遅延が*ItaS*破壊によって改善されることが示された(図2下段)。

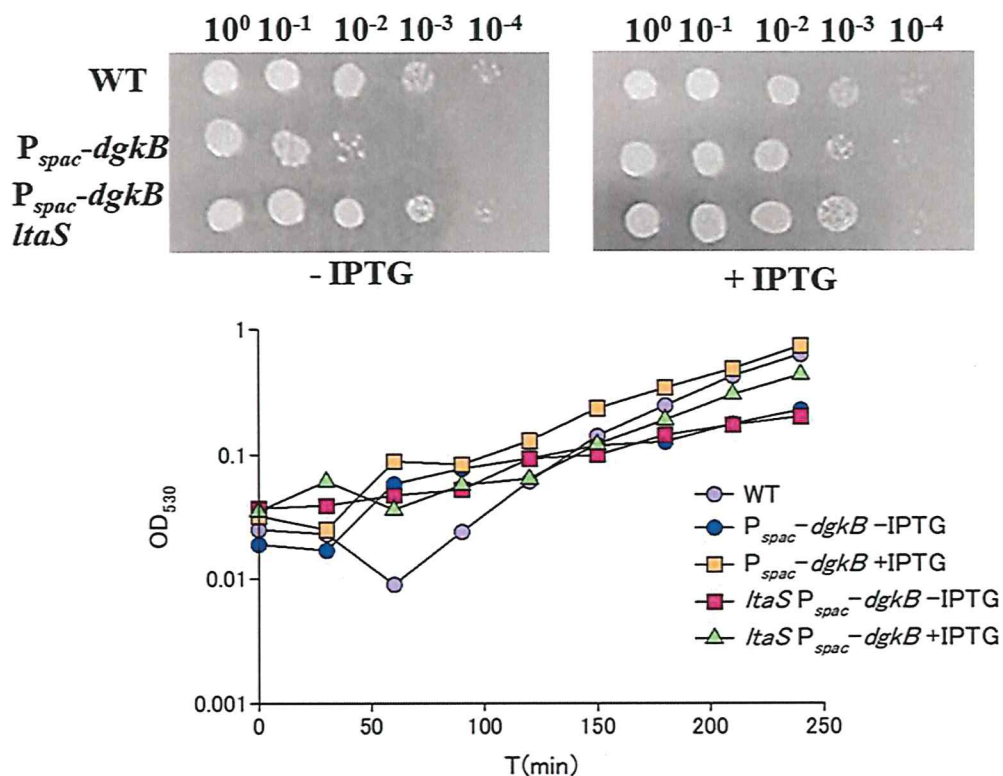


図2 OK2 由来納豆菌遺伝子改変株の生育

SK2を親株とした一連の遺伝子改変納豆菌の生育を図3に示す。寒天培地上では、OK2と同様に、*dgkB*発現制御(P_{spac} -*dgkB*)株において、*dgkB*発現を抑制すると生菌数が低下することが示された。また、生菌数の低下は*ItaS*の破壊によって*dgkB*発現に依存しなくなり、生菌数が親株と同様に回復することが示された(図3上段)。液体

培地での生育では、寒天培地での生育と同様に、*dgkB* 発現抑制による生育停滞が *ItaS* 破壊によって、*dgkB* 発現に依存しなくなり、野生株同様に回復することが示された (図 3 下段)。

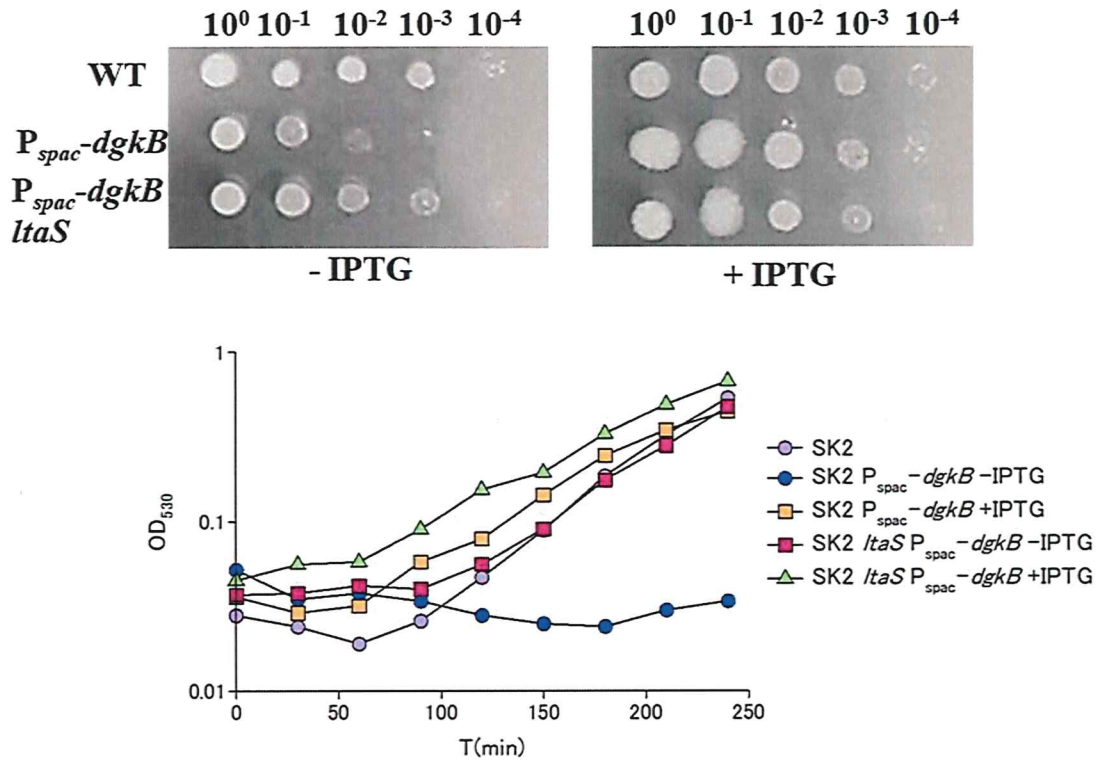


図3 SK2由来納豆菌遺伝子改変株の生育

2-2 脂質組成解析

前述の納豆菌遺伝子改変株における生育の変化が脂質組成変化の影響を受けているのかを明らかにするために脂質組成解析を行った。各菌株から脂質を抽出して TLC によって分離した (図 4)。OK2、SK2 共に DAG の蓄積を許容すると予想される遺伝子改変株 ($P_{spac}\text{-}dgkB$, erm^R , $ltaS::erm^R$) では、DAG の蓄積が見られた。特に *dgkB* の発現抑制条件では DAG の蓄積量が多かった。

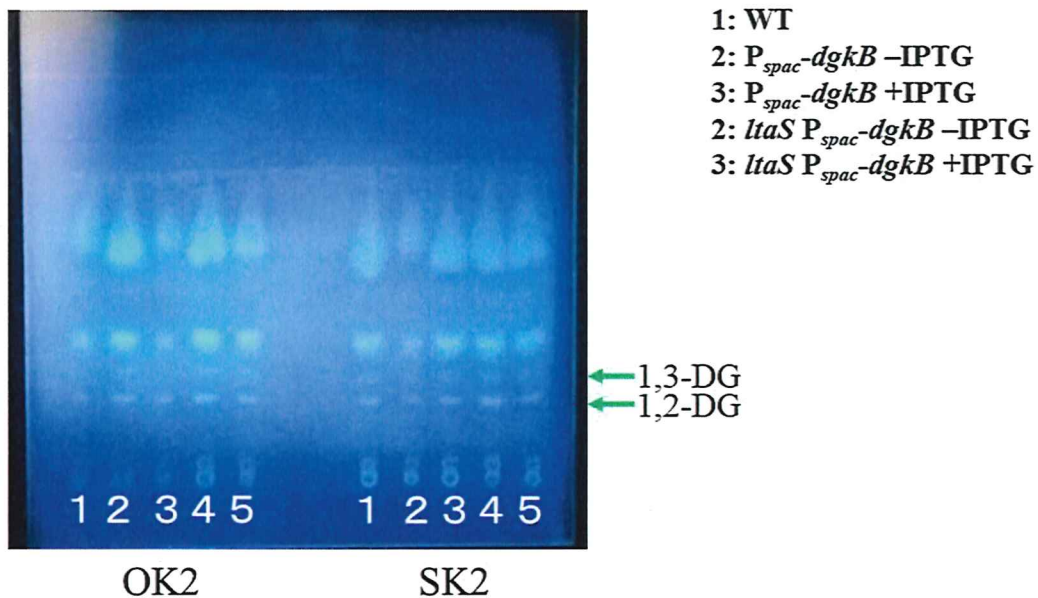


図4 遺伝子改変納豆菌の脂質組成解析

考察

以上の結果から、枯草菌と同様に、納豆菌遺伝子改変によって生育に影響することなく DAG を蓄積する納豆菌の作製に成功した。DAG の蓄積がなぜ生育に有害なのか、また本遺伝子改変株ではなぜ DAG の蓄積にも関わらず野生株と同等の生育が可能であるのかは未解明であり、膜脂質分子の生理機能解明のためにも今後の原因の詳細な解明が望まれる。これらの遺伝子改変は枯草菌においては孢子形成率に影響を与えなかったことから、本遺伝子改変納豆菌でも正常に納豆が作られることが期待できる。

要約

ジアシルグリセロール (DAG) は血中中性脂肪の上昇を抑える効果などが報告されており、昨今の健康志向の高まりに伴い注目されている。本研究では、*mecA* 遺伝子破壊によって高形質転換能力を獲得した納豆菌に枯草菌由来の遺伝子改変を導入し、脂質生合成経路の改変を行った。この遺伝子改変によって、枯草菌での先行研究と同様

に DAG を高蓄積する納豆菌の創生に成功した。作製した 2 系統の遺伝子改変納豆菌では、リポテイコ酸合成酵素遺伝子 *ItaS* の破壊によって、ジアシルグリセロールキナーゼ遺伝子 *dgkB* 発現を抑制しても生育遅延や停滞は見られず、野生株同様に生育することが分かった。また、これらの納豆菌は *dgkB* 発現抑制条件では、より DAG を蓄積することが明らかになった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。本研究で使用した OK2、SK2 株を分与していただいた立教大学名誉教授 河村富士夫先生、法政大学 鈴木祥太博士に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Matsuoka S. (2017) Biological functions of glucolipids in *B. subtilis*. *Genes Genet. Syst.* 92, 217–221.
2. Matsuoka S, Hashimoto M, Kamiya Y, Miyazawa T, Ishikawa K, Hara H, and Matsumoto K. (2011) The *Bacillus subtilis* essential *dgkB* is dispensable in mutants with defective lipoteichoic acid synthesis. *Genes Genet. Syst.* 86, 365–376.
3. Ashikaga S, Nanamiya H, Ohashi Y, and Kawamura F. (2000) Natural Genetic Competence in *Bacillus subtilis* Natto OK2. *J. Bacteriol.* 182, 2411–2415.
4. Bligh EG, Dyer WJ. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.