

〈一般研究課題〉 合成生物学的手法による乳酸高生産

*Bacillus coagulans*の開発

助成研究者 愛知工業大学 金岡 英徳



## 合成生物学的手法による乳酸高生産

### *Bacillus coagulans*の開発

金岡 英徳  
(愛知工業大学)

## Development of high lactic acid producing *Bacillus coagulans* by synthetic biological method

Hidenori Kaneoka  
(Aichi Institute of Technology)

### Abstract :

Lactic acid bacteria (LAB) is a general term for bacteria that ferment sugar to produce lactic acid, which is more than 50% of consumed glucose. There are many genera of LAB, including *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus*, and they are characterized as Gram-positive, anaerobic, and non-motile. LABs are expected to have intestinal regulating and immunoreactive effects, and their importance is widely recognized as probiotics (live microorganisms that provide human health benefits).

Furthermore, lactic acid produced by LAB is also used industrially and is a feedstock for biodegradable plastics. Lactic acid has optical isomers, L-lactic acid and D-lactic acid, and combining these two types of lactic acid can increase the heat resistance and moldability of biodegradable plastics, which has attracted attention from the perspective of SDGs.

Currently, LABs such as *Lactobacillus* spp. are used to produce lactic acid. However, these LABs have high nutrient requirements, and the optimum temperature for lactic acid fermentation is below 40 °C. Therefore, it is necessary to pay attention to contamination by other fast-growing microorganisms such as *E. coli* and yeast. On the other hand, *Bacillus coagulans* (now *Heyndrickxia coagulans*) is considered suitable for lactic acid production because it has a lower nutrient requirement than *Lactobacillus* spp., and its optimum temperature is high (45–55°C), which reduces

the possibility of competition with other microbes. However, research and utilization of *B. coagulans* for application have not been widespread due to the lack of established genetic engineering technology. This study aims to establish genetic engineering technology for *B. coagulans*, which is a bottleneck, and to apply this technology to modify *B. coagulans* for high genetic production of lactic acid.

## 1. はじめに

乳酸菌は糖を分解して乳酸を作る菌の総称であり、消費したブドウ糖から50%以上の乳酸を生成する。乳酸菌には*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*など多くの属があり、グラム陽性、無孢子、嫌気性、および運動性がないなどの特性をもつ。一般的に乳酸菌はヒトの大腸、膣、口腔などに共生しており、栄養素を共生相手より獲得できるので、不要になった遺伝子が脱落し、ゲノムサイズが縮小している。乳酸菌は整腸作用や免疫活性効果が期待され、プロバイオティクス(人間の健康上の利益を与える生きた微生物)としてその重要性が広く認識されている。例えば、乳酸菌により作られるヨーグルトや発酵乳は整腸作用(下痢や便秘の解消を中心とした便性の改善)だけでなく、腸内有用菌である*Lactobacillus*属および*Bifidobacterium*属を増加させ、腸内腐敗菌である*Clostridium*属や大腸菌を減少させることで腸内環境が改善され、便秘を防ぎ、腸内腐敗菌が作る有害物質や発がん性物質の産出を抑え、排泄を促進させる働きを示している。

乳酸菌は乳酸を生産し、生息環境のpHを下げ菌の増殖を抑えることができるため、古来様々な発酵食品の生産に利用され、現在、ヨーグルトのスターターとして*Streptococcus thermophilus*や*Lactobacillus bulgaricus*などが利用されている。また、乳酸は工業的にも利用されており、生分解性プラスチックの原料である。乳酸には光学異性体であるL-乳酸とD-乳酸が存在し、この2つの乳酸を合わせることで生分解性プラスチックの耐熱性や成型加工性を上げることができ、SDGsの視点からも注目されている。

本研究で使用している乳酸菌*Bacillus coagulans* (現 *Heyndrickxia coagulans*)は、枯草菌*Bacillus subtilis*と類縁で、芽胞を形成する有孢子性乳酸菌である(1)。またグラム陽性、通性嫌気性、非病原性で、生育環境は温度35~50℃、pH 5.5~6.5である。芽胞を形成することで耐熱性と耐酸性に優れている。この菌は乳酸を高効率で作るのみならず、食品産業において乳糖の加水分解に利用されるβ-ガラクトシダーゼや、工業的用途が広い加水分解酵素であるアミラーゼを生産することから、幅広く利用されている微生物である(2,3)。これらの特性から培養時に発生する発酵熱の冷却や、換気のための攪拌等が必要でないため、大量培養の際に生じる費用を軽減することができ、効率的に乳酸などの物質の生成が可能である。

近年、微生物はヒスチジinkinaseなどの二成分系センサーとシグナル伝達物質を通して外部環境情報(温度やpH、ストレスなど)を感知して様々な細胞プロセスの制御を行っていることがわかってきた。この過程において細胞内シグナル伝達物質として重要なセカンドメッセンジャーである環状ジヌクレオチドの環状ジアデニル酸(c-di-AMP)と環状ジグアニル酸(c-di-GMP)が働いている。c-di-AMPは主にグラム陽性菌及びいくつかのグラム陰性菌において抗生物質耐性を含む細胞壁の恒常性や浸透圧の維持、DNA損傷修復などに関与している(4,5)。また、c-di-GMPは多くのグラム陰性菌及び少数のグラム陽性菌において鞭毛合成や細胞外高分子物質の生産を誘導し、バイ

オフィーム形成の促進に関わっている(6,7)。

本研究で着目しているc-di-AMPは合成酵素であるdiadenylate cyclase (DAC) によって2分子のATPから合成され、分解酵素であるphosphodiesterase (PDE) によってpApAまたは2分子のAMPに分解される。c-di-AMP合成酵素にはDisA、CdaA、CdaS、CdaM、CdaZの5種があり、c-di-AMP分解酵素にはGdpP、Pde2、PgpH、CdnPの4種がある(8)。c-di-AMP合成酵素は共通してDACドメインをもち、DGAモチーフ(Asp-Gly-Ala)やRHRモチーフ(Arg-His-Arg)が活性に必要である。c-di-AMP分解酵素のGdpPは一般的にN末端から、2つのN末端膜貫通ヘリックス-PASドメイン-不活性なGGDEFドメイン-DHH/DHHA1ドメインという構造を持ち、Pde2はGdpPと同じDHH/DHHA1ドメインをもつが膜貫通ヘリックス、PASドメイン、GGDEFドメインもたない(9)。ほとんどの細菌はc-di-AMP合成酵素としてCdaA、DisAのどちらかを持ち、CdaM、CdaZは限られた細菌だけが持つ。グラム陽性菌のモデル生物であり、*B. coagulans*と類縁である*B. subtilis*はDisA、CdaA、CdaSの3つのc-di-AMP合成酵素をもつ。DisAはDNA完全性走査タンパク質でありDNAの完全性制御に関与しており、金属イオン $Mn^{2+}$ または $Co^{2+}$ の存在下で活性を示す。CdaAは調節タンパク質CdaRによって制御されており、遺伝子*cdaA*および*cdaR*は細胞壁の主要物資であるペプチドグリカンの合成を担うglucosamine phosphomutaseをコードする*glmM*と同じオペロンに位置しているため、CdaAは細胞壁の合成と恒常性に関与している可能性がある。活性は金属イオン $Mn^{2+}$ または $Co^{2+}$ 存在下で示す。CdaSは*Bacillus*属と*Clostridium*属のみに存在し、胞子形成に関与しており、胞子の発芽中に発現する。活性はアルカリ条件下で金属イオン $Mg^{2+}$ に厳密に依存する(9)。細菌が生成したこれらの環状ジヌクレオチドは、マクロファージのSTINGタンパク質と結合して自然免疫活性を誘導することが報告されており、粘膜ワクチンのアジュバンドとして期待されている(10,11)。

本研究では*B. coagulans*のc-di-AMP合成量を遺伝子組換えにより増幅させることで、増殖性や耐酸性の改良を試み、医薬分野や工業分野において活躍することができる菌の開発を目標とし、研究を行っている。

## 2. 試料および実験方法

### 2.1 *B. coagulans* NBRC12583株および*E. coli* BL21株の培養

*B.coagulans* NBRC12583株は802培地(10 g/Lハイポリペプトン、2 g/L酵母エキス、1 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g/L  $K_2HPO_4$ 、pH 7.0)で37℃、180 rpmで振盪培養し、継代・維持した。

*E.coli* BL21株はLB培地(5 g/Lハイポリペプトン、2.5 g/L酵母エキス、5 g/L NaCl、pH 7.0)で37℃、180 rpmで振盪培養し、継代・維持した。

### 2.2 プラスミドの構築

c-di-AMP合成酵素の活性測定のために、pET\_Blue2プラスミドに*B.coagulans* NBRC12583株のゲノムからPCRにより増幅した*cdaA*遺伝子を導入した(pET\_Blue2::*cdaA*)。また、*B.coagulans*のL-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*L-ldh1*)を*Lactobacillus delbrueckii*由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*D-ldh*)と組み換えるためのプラスミド、およびc-di-AMP分解酵素遺伝子(*gdpP*)を遺伝子ノックアウトするためのプラスミドをpBlueプラスミドをもとに構築した。

### 2.3 c-di-AMP合成酵素CdaAの活性測定

pET\_Blue2とpET\_Blue2::*cdaA*を導入した*E. coli* BL21株を 50 µg/mL のアンピシリンを含んだLB液体培地で一晚振盪培養(37℃、160 rpm)した。新しいLB培地10 mLに培養液を加えて、OD<sub>600</sub> = 0.5 になるまで培養した。培養液に 1 mMになるようにIPTGを添加して37℃、160 rpm、3 時間培養した。菌体を4℃、5,000 × g、5分、遠心分離し上清を捨てた。洗浄バッファーとして KMP バッファー(1.74 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.24 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)に懸濁し、4℃、5,000 × gで5分間遠心分離、上清を捨てた。洗浄は2回繰り返した。c-di-AMPの測定ではペレット状態のサンプルを500 µLの氷冷抽出バッファーに懸濁した。懸濁液を4℃で15分間静置した後、95℃で10 分間加熱し、すぐに冷却した。4℃、20,000 × g、5 分間遠心し、150 µLの氷冷抽出バッファーを加えて、再び4℃、20,000 × g、5 分間遠心した。上清を回収し、300 µLの氷冷抽出バッファーを再び加え、同条件で遠心し、上清を回収した。上清を凍結乾燥後、沈殿を150 µLの滅菌水に溶解し、Cyclic di-AMP ELISA Kitを用いてc-di-AMPの測定を行った。

### 2.4 *B. coagulans* NBRC12583株への遺伝子導入

*B.coagulans* NBRC12583株を10 mLの802培地で一晚振盪培養(37℃、160 rpm)し、その菌液を1%グリシンを含む802液体培地100 mLに添加してOD<sub>600</sub> = 0.5~1.0になるまで振盪培養した。その後、菌体を4℃、6,000 rpm、10分間遠心分離し上清を捨てた。洗浄バッファーとしてSG buffer (10%グリセロール、0.5 Mスクロース、1 mM MgCl<sub>2</sub>)に懸濁し、4℃、6,000 rpm で 10分間遠心分離し、上清を捨てた。洗浄は3回繰り返した。洗浄後、菌体ペレットを100 µLのSG bufferに懸濁し、1 µgのプラスミドを添加した。その後、氷冷した0.1 cmのエレクトロポレーションキューベットの移した。Gene Pulser Xcell™コンプリートシステムを使用し、1.5 kV、25 µF、200 Ωでエレクトロポレーションを行った。その後、パルスを加えた菌液をRM培地(20 g/Lグルコース、10 g/L酵母エキス、2.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)100 µLに加え、45℃で3 時間回復培養を行った。回復培養後、培養液を2 µg/mL エリスロマイシンを含む802寒天培地に100 µLプレーティングし、40℃で培養させた。

また、プラスミドの導入を確認するために、生育したコロニーを802液体培地に加え、振盪培養し、対数増殖期の末期に到達した菌体を回収した。その後、NucleoSpin® Microbial DNAを用い、所定のプロトコルに従い、ゲノム及びプラスミドの抽出を行った。抽出したDNA溶液を鋳型として、PCRを行い、電気泳動によりバンドを確認した。

## 3. 実験結果

### 3.1 *B. coagulans* c-di-AMP合成酵素CdaAの活性測定と菌体内c-di-AMP濃度

*B.coagulans*のc-di-AMP合成酵素(CdaA)、分解酵素(GdpP, Pde2)の生理機能解析のため、まず酵素活性の確認を行なった。もともとc-di-AMPを生産していない*E. coli* BL21株にpET\_Blue2::*cdaA*を導入し、c-di-AMPの生産量を測定した。pET\_Blue2::*cdaA*を導入した*E. coli* BL21株は菌体内に、 $8.1 \times 10^{-3}$  µg/mLのc-di-AMPが検出されたが、コントロールプラスミド(pET\_Blue2)を導入した方は、c-di-AMPがほとんど検出されなかった(図1)。また、遺伝子導入を行っていない*B.coagulans* NBRC12583株を測定したところ、 $3.1 \times 10^{-4}$  µg/mLのc-di-AMPが検出された。これ

らの結果から、*B.coagulans*のCdaAには活性があることが確認され、その活性により*B.coagulans*の菌体内には、c-di-AMPがある程度生産されていることがわかった。

### 3.2 *B. coagulans*への遺伝子導入

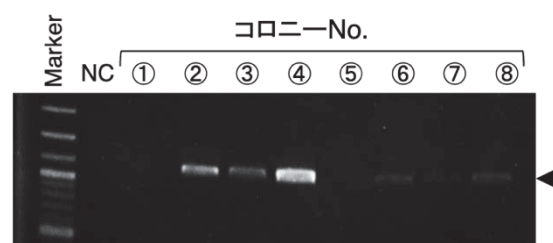
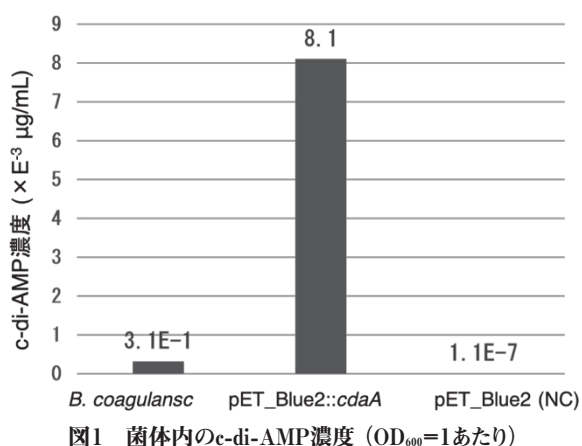
*B.coagulans*の菌体内にc-di-AMPの存在が確認できたため、次は遺伝子組換えにより細胞内のc-di-AMP濃度を变化させるため、c-di-AMP分解酵素遺伝子*gdpP*のノックアウトプラスミド、およびD-乳酸生産のための*D-ldh*遺伝子導入プラスミドを構築した。まず、*gdpP*ノックアウトプラスミドを様々なエレクトロポレーション条件で*B.coagulans*に導入したところ、最大で $5.0 \times 10^4$  CFU/ $\mu$ gの形質転換効率でコロニーが形成された。これらのコロニーが導入プラスミドを有しているかを確認するために、液体培養したコロニーからDNAを精製してPCRによるプラスミド検出を行った。PCRを行なった8つのコロニーのうち5つからプラスミドが検出され、遺伝子導入を確認することができた(図2)。

## 4. まとめ

本研究では、*B. coagulans*がもつc-di-AMP合成酵素 (CdaA)、分解酵素(GdpP, Pde2)の生理機能解析のため、*B. coagulans*のCdaAを大腸菌内で過剰発現し、c-di-AMP菌体内濃度を測定した。この結果、*B. coagulans*のCdaAは活性を持ち、*B. coagulans*の菌体内にはc-di-AMPが生産されていることがわかった。次に、*B. coagulans*のc-di-AMP分解酵素遺伝子ノックアウトを行うために、プラスミドを構築し、エレクトロポレーションにより*B. coagulans*への遺伝子導入を行なった。様々な条件検討の結果、形質転換効率は低いもののコロニーが形成され、それらのコロニーからは導入プラスミドが検出された。今後、導入プラスミドによる遺伝子組換えを継続して行い、乳酸高生産株の樹立を目指す。

## 5. 参考文献

- (1) M. E. Becker, C. S. Pederson (1950). The physiological character of *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*). J. Bacteriol., **59**, 717-725.
- (2) F. Su, P. Xu (2014). Genomic analysis of thermophilic *Bacillus coagulans* strains: efficient producers for platform bio-chemicals. Sci. Rep., **4**, 3926.
- (3) G. Konuray, Z. Erginkaya (2018). Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry.





Foods, **7**, 92.

- (4) F. M. P. Mehene, K. Gunka, H. Eilers, C. Herzberg, V. Kaefer, J. Stülke (2013). Cyclic Di-AMP Homeostasis in *Bacillus subtilis*: BOTH LACK AND HIGH LEVEL ACCUMULATION OF THE NUCLEOTIDE ARE DETRIMENTAL FOR CELL GROWTH. *J. Biol. Chem.*, **288**, 2004-2017.
- (5) W. Yin, X. Cai, H. Ma, L. Zhu, Y. Zhang, S. Chou, M. Y. Galperin, J. He (2020). A decade of research on the second messenger c-di-AMP. *FEMS Microbiol Rev.*, **44**, 701-724.
- (6) U. Römling, M. Y. Galperin, M. Gomelsky (2013). Cyclic di-GMP: The first 25 year of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **77**, 1-52.
- (7) B. Purcell, R. Tamayo (2016). Cyclic diguanylate signaling in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, **40**, 753-773.
- (8) T. Fahmi, G. C. Port K. H. Cho (2017). c-di-AMP: Essential molecule in the signaling pathways that regulate the viability and virulence of gram positive bacteria. *Genes*, **8**, 197.
- (9) Z. O. Xing, Y. Z. Fan, L. Z. Ai (2020). The second messenger c-di-AMP mediates bacterial exopolysaccharide biosynthesis: a review. *Molecular Biology Reports.*, **47**, 9149-9157.
- (10) D. L. Burdette, K. M. Monroe, K. Sotelo-Troha, J. S. Iwing, B. Eckerdt, M. Hyodo, Y. Hayakawa, R. E. Vance (2012). STING is a direct innate immune sensor of cyclic-di-GMP. *Nature*, **478**, 515-518.
- (11) I. Quintana, M. Espariz, S. R. Villaar, F. B. Gonzalez, M. F. Pacini, G. Cabrera, I. Bontempi, E. Prochetto, J. Stülke, A. R. Perez, I. Marcipar, V. Blancato, C. Magni (2018). Genetic engineering of *Lactococcus lactis* co-producing antigen and the mucosal adjuvant 3'5'-cyclic di adenosine monophosphate (c-di-AMP) as a design strategy to develop a mucosal vaccine prototype. *Front Microbiol.*, **9**, 21008