

乳酸菌の長寿遺伝子サーチュインが 果たす根源的な機能の発見： タンパク質合成と細胞分裂の制御

中 川 純 一^{*†}

(平成 30 年 11 月 22 日受付/平成 30 年 12 月 7 日受理)

要約：サーチュインは健康長寿を支える遺伝子とされ、ほとんどの生物にある。その実体は、有核生物では、主としてヒストン、p53 他のアセチル化タンパク質を基質とする NAD⁺ 依存性リジン脱アセチル化酵素、原核生物では、コバラミン合成に関する *cobB* として同定された後、代謝酵素、転写制御因子及び走化性タンパク質の脱アセチル化に関わると報告された。一方プロバイオティクスとして注目されている乳酸菌もサーチュインを持つが、その役割は不明であった。乳酸菌自身にとっても、サーチュインは健康維持の長寿遺伝子なのか？それが本研究の出発点であった。プロバイオティクスや醗酵のスターターに用いられてきた *Lactobacillus paracasei* を対象として、まず遺伝子 *sirA* をクローニングすることから手掛け、組換えタンパク質 LpSirA を作成した。次に LpSirA のリジン脱アセチル化酵素反応を検証し、その細胞内基質の一つが 30S リボソームタンパク質 S4 であることを見出した。続いて、抗 LpSirA 抗体を作り、菌体細胞内のサーチュインの局在を、免疫染色法及び蛍光タンパク質融合による生細胞の観察、最終的には免疫電子顕微鏡撮影したところ、細胞全長にわたる緩めの螺旋状の局在、または細胞分裂面と細胞極に濃密に局在することを発見した。更に *sirA* 欠損株、*sirA* 過剰発現株を作成してみると、野生株に比べて *sirA* 欠損株は細胞長が短く、逆に *sirA* 過剰発現株は細胞長が長いことが判明した。これらの結果は、タンパク質合成制御に加えて、サーチュインが細胞分裂と細胞形態形成という、生命維持に本質的な機能を持つことを示した。更にストレス耐性に関するデータも得て、乳酸菌サーチュインを人為的に制御することができれば、プロバイオティクスとしての機能を高め、ひいては宿主の健康長寿維持にも役立つ可能性があるのではないかと考えるに至った。

キーワード：サーチュイン、乳酸菌、アセチル化タンパク質、細胞内局在、タンパク質合成、細胞分裂

はじめに

昨 2017 年の厚生労働省の発表によれば、日本人の平均寿命は女性が 87.14 歳、男性が 80.98 歳であり、世界でもトップクラスだという。ただし、高齢でも自立して生活できている、別の言葉で言えば、病気で苦しい思いをしているとか、介護が必要であるという状態でない、いわゆる「健康寿命」について見ると、女性は上記の数字よりも 12 年短く、男性は 9 年短い。それほど長い期間、不自由な苦しい生活を続け、また家族の負担も増えているのが実態ということになり、社会問題と認識されつつある。平均寿命と健康寿命の差が少ないことが幸せな人生と言えるのだが、それは個人差がとても大きい。遺伝なのか、食事や運動に関わる生活習慣か、ストレスを抱えているか、など、色々な要因が考えられるが、近年「健康で長生きする」ように働く特別な遺伝子があるらしいとわかってきた。

サーチュインという言葉が、健康長寿のキーワードの一つとして認識されるようになったのは、2000 年前後からで

ある。一つの発端は、フランス人が、あんなにワインを飲んで、高脂肪食を食べているのに、なぜ周辺の国々よりも心臓疾患の発症率が明らかに少ないのかという、いわゆるフレンチパラドックスの原因として想定されたのが、赤ワインに含まれるポリフェノールの一種レスベラトロールにあるとされたことにあった。そのレスベラトロールが、サーチュインという酵素を活性化するのが作用点である、という報告がセンセーションを巻き起こしたのだ。このタンパク質の酵素反応は、タンパク質脱アセチル化作用であることは、米国在住の今井博士等によって証明された¹⁾。一方レスベラトロールの作用だとされたサーチュイン賦活化活性²⁾は、その後アーティファクト（研究者の測定方法が不適切であったために観察された人為的なものであって、自然界の出来事の実態ではない）という論争が起きて、未だに決着はついていない。ただ、その論争とは別に、サーチュイン自体が健康長寿に重要な役割を果たしており、それはカロリー制限によって健康長寿がもたらされるという現象に通じていることが、様々な科学的な証拠から広く認めら

* 東京農業大学名誉教授

† Corresponding author (E-mail : j3nakagawa@gmail.com)

れるに至った^{3,4)}。そして、事実この遺伝子の存在、またはその発現の昂進が長寿をもたらすことが、酵母、ショウジョウバエ、線虫、ネズミなどの多くの生物モデルで検証・確立された⁵⁻⁷⁾。

人には7種類のサーチュインのアイソザイム（同一の酵素反応を行うと考えられる、少しだけアミノ酸配列の異なるタンパク質）があって、細胞質型、細胞核型、ミトコンドリア型という局在の違いも知られている^{8,9)}。中でも詳細な研究が進んだ細胞核型の SIRT1 と呼ばれる酵素は 70 kDa 程度の大きさがあり、一方ミトコンドリア型の SIRT3 や 4 や 5 というのは、細菌型に近いと類推されるのだが、実際サイズの点でも 30 kDa 前後と小さい。ここから、それぞれのアイソザイムが標的とする基質タンパク質が異なっていて、それもけっこう広範囲であろうと想像されるわけである。

その脱アセチル化反応を受ける基質の中でも、体内のホメオスタシスや長寿に関わりそうだと注目されたのは、ヒストンタンパク質である。有核生物の遺伝子 DNA は、染色体という構造の中に折りたたまれて整頓されている。DNA は長い釣り糸のようなものであるから、それが糸巻にまかれていなかったら、めちゃくちゃに絡まってしまうだろうということは、想像に難くない。糸巻に相当するのが、ヒストンという一群のタンパク質の複合体で、DNA と相互作用する塩基性のタンパク質から構成されている。4 種類のヒストンの中で H1 というのが土台になって、そこに H2, H3A, H3B, H4 が結合して複合体を形成し、その全体が糸巻になる。ここに DNA の糸が 1 回転半強（146 塩基分）巻きついて、一つの染色質（クロマチン）の単位となっている。膨大な数の染色質が、さらに折りたたまれて染色体（クルモゾーム）となり、これが細胞分裂時の細胞を色素で染めると X とか Y の形に見えるものである。タンパク質が陽電化を帯びていて、DNA が負電荷を帯びているために、その引き合いの力で相互作用しているのだが、タンパク質を構成するアミノ酸のリジンには 1 つ余分なアミノ基（ε アミノ基）があって、ここに、アセチル基（-COCH₃）という負電荷を帯びた官能基が結合すると、リジン残基の陽電荷が中和される。すると DNA との巻きつきが少し緩むことになる。このことが、その緩んだ領域にコードされている遺伝子への転写関連因子の接近を可能にし、結果として遺伝子の転写が高まるということがわかってきた。

逆にアセチル基が取りのぞかれてしまうと、ヒストンと DNA の結びつきが強固になって、その領域の遺伝子発現が抑制される。図 1 に示したのは、手がヒストン複合体を模しており、そこに DNA の糸が巻き付いているという構図である。この巻き付き構造が締まったり、緩んだりすることをクロマチンリモデリング（染色質の再編成）という。有核生物ではこの現象は認められているが、細胞核をもたない微生物などの原核生物においては、染色体構造は認められていない。それでも、DNA がめちゃくちゃに絡み合っているのでは、細胞分裂も出来ないのだから、それなりに DNA の密度の濃い領域が電子顕微鏡観察でも認めら

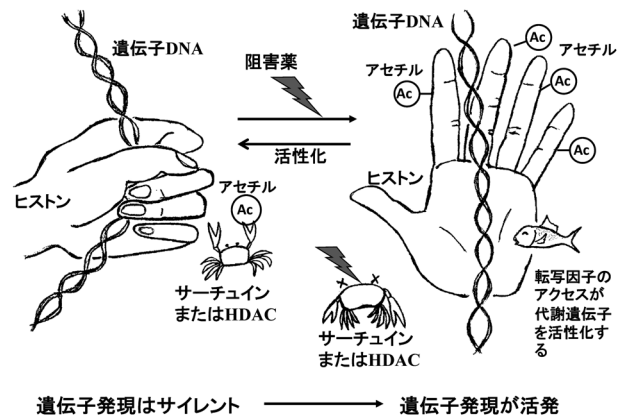


図 1 ヒストン脱アセチル化とクロマチンリモデリングの模式
手がヒストン複合体を表し、蟹は脱アセチル化酵素を表している。

れていて、ヌクレオソームと呼ばれている。おそらくタンパク質が相互作用するだけでなく、細胞壁と一部が固定されていて、細胞壁が伸長することにあいまって、娘 DNA が分離されると考えられる。有核生物ではチューブリンというタンパク質がつくる染色糸が細胞の端とつながって、染色体を両側に引っ張って分離することが観察されるが、細菌では、その引き離しを担う剛構造は伸長する細胞側壁だといわれている。

では細菌類には、サーチュインは無いのだろうか？それがこの研究の発端である。実はサーチュインホモログ、つまり明らかに同じ進化系統から発生している類似タンパク質は、分子生物学領域の研究が進んでいる大腸菌や枯草菌ですで見ついていることは、ちょっとゲノム情報を検索すればわかる¹⁰⁻¹²⁾。私達が特に興味をもったのは、健康維持において、赤ちゃんから老年まで、腸内細菌として、人生を通して人に利益をもたらしている乳酸菌ではどのようなのだろうかということである。

乳酸菌は、発酵食品のスターターおよびプロバイオティクスとして広く利用され、WHO によりプロバイオティクスは「一定量摂取することで、宿主に有益な作用をもたらす、生きた微生物」として定義された¹³⁾。乳酸菌の重要な作用として腸管内細菌叢のバランスを保つことや、免疫賦活作用、アトピー性皮膚炎の改善、ビロリ菌の抑制、アレルギー反応の軽減などが挙げられる¹⁴⁻¹⁸⁾。

食品科学科（現・食香粧化学科）の中の微生物研究というと、安全性に関わる食中毒菌か、逆に口にいられてもよい醗酵に関わる菌や、健康に寄与する乳酸菌やビフィズス菌をテーマにすべきだと着任してから考えていた頃である。

乳酸菌のゲノム情報をヒトや大腸菌のサーチュイン（コバミン代謝に関連する因子として見つかったために、遺伝子としては、*cobB* という名前がついている）を基にして、解析してみると、面白いことが分かった。すなわち、登録されているゲノム情報の得られる乳酸桿菌 *Lactobacillus* 属の総てが、サーチュイン遺伝子を持っていた。1 つしかない菌種もあるが、3 種類位のアイソザイムを持つものもある。ビフィズス菌は複数のサーチュインを持っているものが多

い。ところが、乳酸球菌である *Lactococcus* 属細菌のゲノムにはこれがみつからない。しかし、類縁の *Streptococcus* 属ではこれを持つものがある。さらに大腸菌や枯草菌と異なると、乳酸桿菌には高等生物のもっているもう一つの加水分解型の亜鉛依存性の別系統の脱アセチル化酵素群（通称 HDAC）の遺伝子がないことが興味を引いた。人は 11 種類もの HDAC のアイソザイムを有しているのに、乳酸桿菌はこれがないとすると、サーチュインの役割こそ重要なのだろうが、それも一つしかないのであれば、それを解析すれば、進化の原初段階の脱アセチル化酵素の役割がつかめられるだろうと考えたわけである。

乳酸菌の胆汁酸耐性能の観察

以前わが研究室において、酵母のサーチュインである SIR3, SIR4 を欠損させた株はアルコールや過酸化水素に対して耐性を持つことが明らかとなっている¹⁹⁾。それならば、乳酸菌のサーチュインにおいても何らかのストレス耐性への関与が示されるのではないかと考えた。

世田谷キャンパスの菌株保存室の室長を兼任していた岡田早苗教授（現名誉教授）に相談したところ、動物由来の標準株 (NRIC0644) と、彼と彼の大学院生だったサンチェス氏（後のフィリピン大学ロスバニョス校学長）が単離した、植物由来のコンポスト (NRIC1981)、および、サトウキビワイン (NRIC1917) から得た 3 つの株を分与していただいた。この 3 株にはストレス耐性に違いがあるとされ、そこにサーチュインが関与しているかどうか、そんな漠然としたところから出発した。まず 3 株に胆汁酸の主成分であるコール酸を添加し、生育への影響を観察したところ、植物由来株はやや耐性だが、3 株全てコール酸濃度の上昇に伴って生育が抑制された（図 2）。

次に、高等生物のサーチュインの酵素活性を賦活するとされるレスベラトロールを、友人のスイス人研究者シュヴァーガー博士から分けてもらって、培地に加えたら、ストレスに強くなるかどうかを調べてみた。そこで、酵母及びヒトの、サーチュインの脱アセチル化活性に影響を及ぼす事が報告されているレスベラトロール (DSM Schweiz, Basel, Switzerland)、および反対に阻害剤であるスラミン (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA)²⁰⁾ を用い、乳酸菌のコール酸耐性能への影響を解析した。

その結果、3 株全てレスベラトロールを添加した菌体ではコール酸耐性能の上昇が示され、スラミンを添加した菌体ではコール酸耐性能の減少が示された（図 3）。

この事はサーチュインと乳酸菌のコール酸耐性能との関連を示唆している。しかし、現段階ではコール酸耐性能の上昇がサーチュインの脱アセチル化による遺伝子発現調節なのか、それともストレス応答遺伝子としての限定的な働きによるものなのかは不明であり、どうも判然としなかった。これを確認するには、乳酸菌のサーチュイン遺伝子をクローニングして、組換えタンパク質を作成し、実際に脱アセチル化活性を持つのか解析する必要があった。できれば、レスベラトロール及びスラミンによりサーチュイン活性が変化するのかの解析にこぎつけたかったわけである。

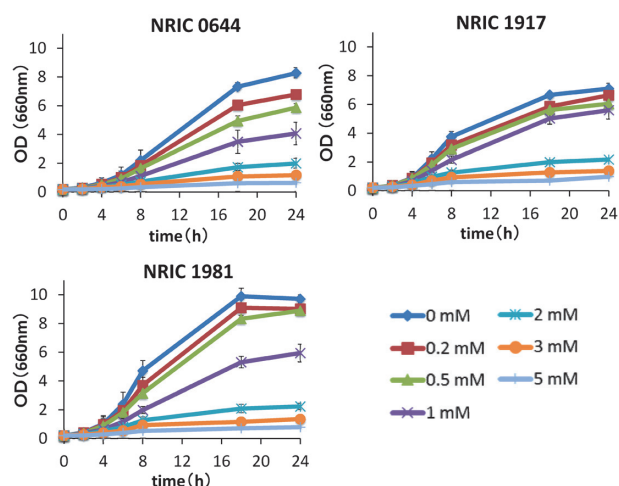


図 2 コール酸濃度別の生育曲線

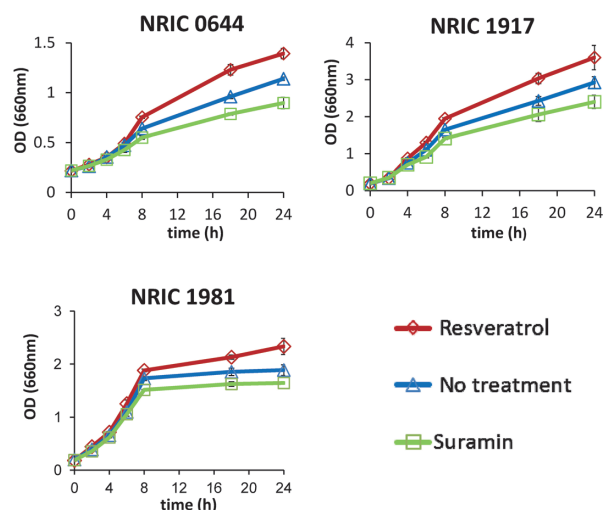


図 3 レスベラトロールおよびスラミンによるコール酸耐性能への影響
コール酸の終濃度は 2mM に調整し、レスベラトロールは終濃度 100 μ M、スラミンは終濃度 10 μ M となるように添加した。

Lactobacillus paracasei サーチュイン遺伝子の同定および他種サーチュインとの相同性解析

ここで、後にこのテーマで博士号を得ることになる新穂高さんが研究室に入ってきた。聡明なだけでなく馬力がある彼をみて、いよいよクローニングに取り掛かろうと思い立ち、DNA の扱いを教えると、ほどなくして、ゲノム情報で得た配列からプライマーをデザインして PCR クローニングを試み、期待の持てる DNA 断片を取得してくれた。それも上述の 3 つの株総てからである。これをサブクローニングして、DNA 配列解析を行った²¹⁾。両方向から解読して決定した配列を、ヒト、酵母、大腸菌などのサーチュインと比較してみると、見事に相同性の高い部分と、そうでない部分があることが分かった（図 4）。相同性が極めて高い部分は 2 か所、すなわち補酵素である NAD⁺ の

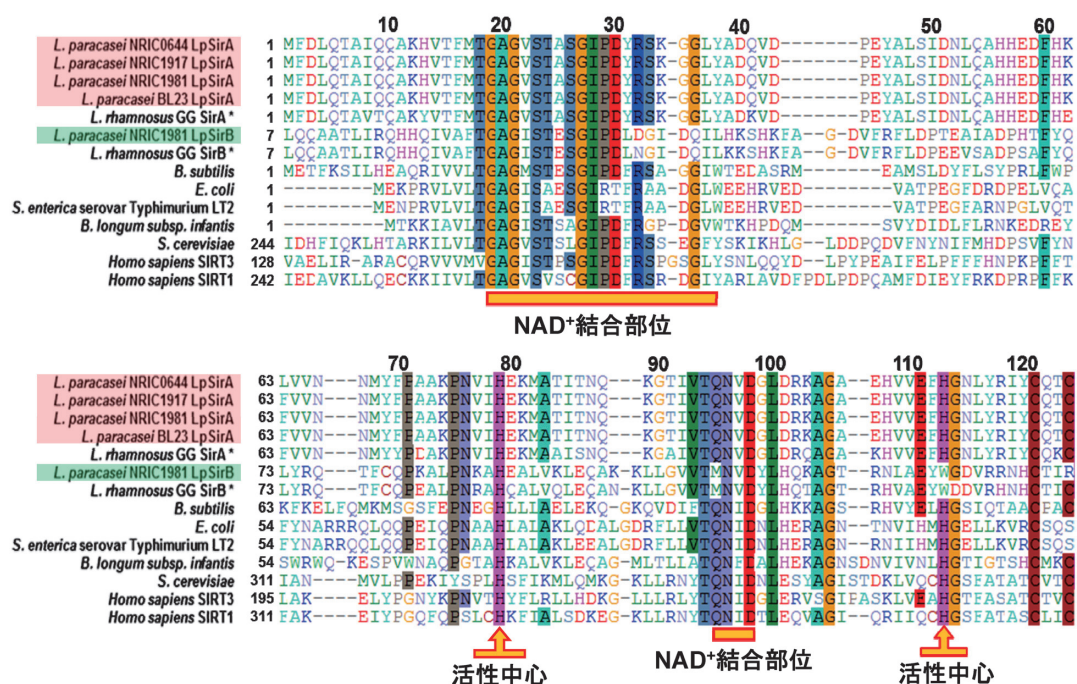


図 4 他種サージュインとの相同性解析

LpSirA の全長は 230aa だが、ここでは共通性の高い前半部分のみを示した。Accession numbers などの詳細については文献 28 を参照。

結合部位、そして、活性中心のヒスチジン残基であった。このことは、基本的な脱アセチル化酵素活性はそれぞれのホモログに進化を通して保持されているが、おそらく、対象となっている基質特異性や、相互作用する因子が異なっていることを示唆していた。原核細胞にはヒストンが無いのであるから、標的が異なるのは当然である。この酵素活性が乳酸菌のホモログにも実際に保持されている可能性が高いが、それを証明することが次なるテーマとなった。

サージュイン組換えタンパク質の構築および脱アセチル化酵素活性測定

新氏は、クローニングした DNA 断片の N 末端にヒスチジンが 6 つ連続した人工的な頭を挿入し、これを大腸菌に導入し、タンパク質を大量発現させ、ヒスチジンが連続していることでニッケルにキレート作用する性質を得ることを利用して、ニッケルカラムを使って、精製した (図 5)。

この時、彼は 3 つの株から得た遺伝子を総て同じ方法で発現させて、4 つの遺伝子組換えタンパク質を得た。なぜなら、3 つの株で基本的に極めてアミノ酸配列の類似している (99%) 遺伝子と、NRIC1981 株だけがもっていた二つ目の、相同性が低い、むしろ類縁の別の菌種である *Lactobacillus rhamunossus* のホモログと相同性が 80% ある遺伝子群の総ての活性を試験するためであった。酵素活性は Flour de Lys[®] fluorimetric activity measurement kit (Biomol/ENZO, Exeter UK) を用いて解析し、相対蛍光強度は NanoDrop 3300 Fluorospectrometer を用いて測定を行った。ヒト p53 (379-382 aa) からなるアセチル化ペプチドを基質として用い、コントロールである組換え SIRT1 タンパク質は、同キット付属のタンパク質を用いた。

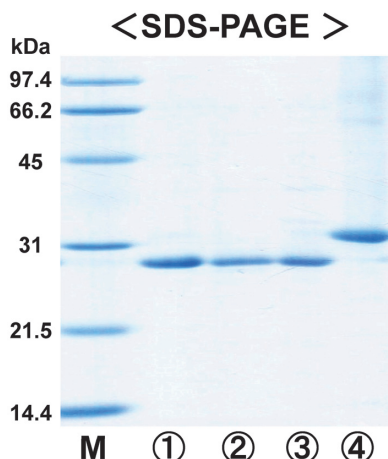


図 5 LpSirA および LpSirB 組換えタンパク質の発現及び精製それぞれの分子量は
①NRIC0644 LpSirA (29 kDa), ②NRIC1917 LpSirA (29 kDa),
③NRIC1981 LpSirA (29 kDa), ④NRIC1981 LpSirB (34 kDa)

結果は、アミノ酸配列が類似している 3 つサージュインタンパク質は活性が見られたが (図 6), *L. rhamunossus* 型で相同性がやや低いサージュインタンパク質には脱アセチル化活性が存在しなかった。これは何らかの進化の過程で交雑してしまったが、偽遺伝子となっていて、機能していないと考えられた。同じ反応系で、至適温度は、45-50℃で、ヒト SIRT1 (37℃) より高いことを発見した (図 7)。

これに加えて、懸案であった、SIRT1 の賦活剤であるレスベラトロールと、SIRT1 の阻害剤であるスラミンの酵素活性への影響を試験した。その結果、レスベラトロールは SIRT1 の Km 値を減少させることを確認したが、NRIC

0644 LpSirA の K_m 値への影響に関しては未だ確たる結論は出ていない (図 8)。ちなみに、SIRT1 のアミノ酸配列上にレスベラトロールの結合する 230 番目のグルタミン酸を含む N-末端ドメインが存在すると報告されている^{22,23)}。しかし、*L. paracasei* の LpSirA はその部分が欠落している為、効果が出ない可能性がある。再現性を確認すると共に、LpSirA の酵素活性を強力に賦活する新規賦活剤の探索も将来的には必要であると考えている。また、スラミンはヒト SIRT1 および NRIC 0644 LpSirA 両方の脱アセチル

ル化酵素活性の阻害を行い、酵素活性が 50% 阻害されるスラミンの濃度はヒト SIRT1 で 18 μM および NRIC 0644 LpSirA で 359 μM であることが明らかとなった (図 8)。これらの結果はヒト SIRT1 と *L. paracasei* LpSirA の酵素の諸性質の類似点と相違点を示している。

L. paracasei BL23 におけるサーチュインの標的タンパク質の探索

L. paracasei BL23 サーチュインの生理機能へのヒントとなるであろう標的タンパク質探索に関しては、まず初めに *in vivo* 試験として、培地中に阻害剤であるニコチンアミド (以下 NAM)²⁴⁾ を添加し、脱アセチル化酵素活性を阻害することにより、選抜を行った。一方でこれを相補すべき *in vitro* 試験として、菌体粗抽出液に対して、 NAD^+ 依存的な脱アセチル反応を最大限に行う為に、 NAD^+ および精製組換え LpSirA を反応系に添加し、酵素反応を行った。*in vivo* および *in vitro* 試験より得られたタンパク質を市販の抗 Acetylated-Lysine primary antibody を用いて Western blotting 解析を行った所、サーチュインの標的タンパク質として 28 kDa のアセチル化タンパク質の存在が示された (図 9)。

続いて、28 kDa のアセチル化タンパク質を、硫酸沈殿 (0-80%)、Butyl-Toyopearl カラムおよび DE52 カラムを用いて精製を行った。その結果、28 kDa のアセチル化タンパク質の単一バンドを得ることができ (図 10-A, B)、更にこのタンパク質は LpSirA によって脱アセチル化されることが確認された (図 10-C)。得られた 28 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を、Peptide sequencer PPSQ30 を用いたエドマン分解法により解析した結果、N 末端アミノ酸配列は SRYTGPRWKQ であることが示され、その配列はデータバンクに登録されている *L. paracasei* の 30S ribosomal protein S4 のものと完全に一致した。30S ribosomal protein S4 の機能として、30S ribosomal protein S5 および S12 と共に、rRNA と会合を行うことが知られている^{25,26)}。加えて、ミトコンドリアのサーチュイン (SIRT3) がミトコンドリアの ribosomal large subunit component MRP10 を脱アセチル化し、それにより、タンパク質合成量が減少したという事が知られている²⁷⁾。つまり、*L.*

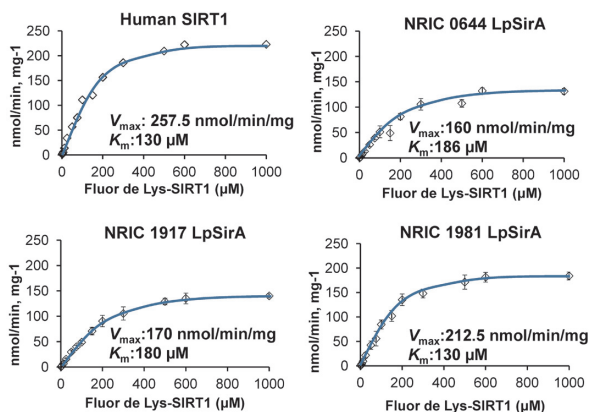


図 6 脱アセチル化酵素活性の測定

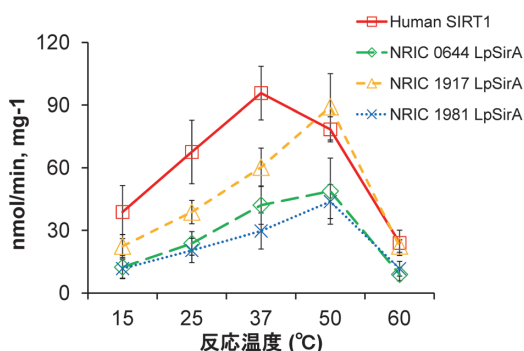


図 7 脱アセチル化反応の至適温度解析

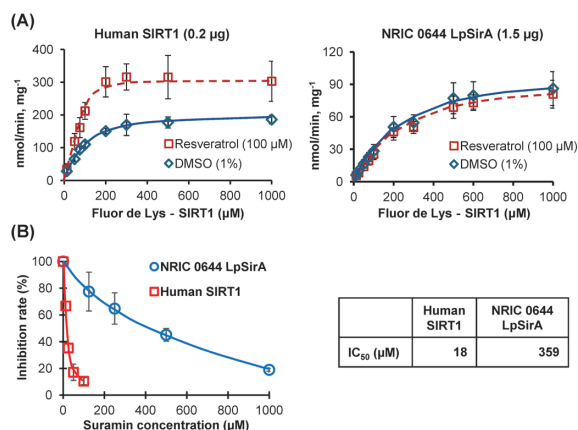


図 8 レスベラトロールおよびスラミンによる脱アセチル化酵素活性への影響
(A) はレスベラトロール, (B) はスラミン。

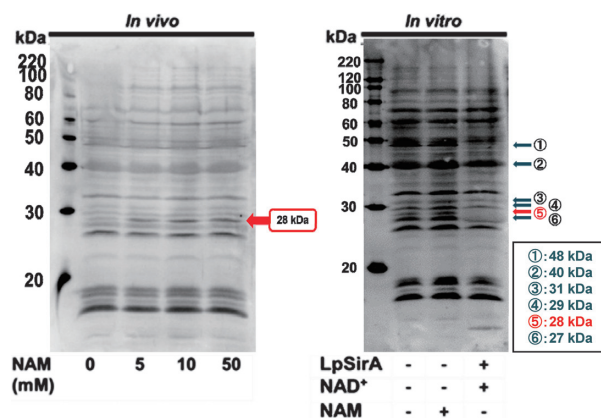


図 9 無細胞試験 (*in vitro*) と生体内試験 (*in vivo*) の結果

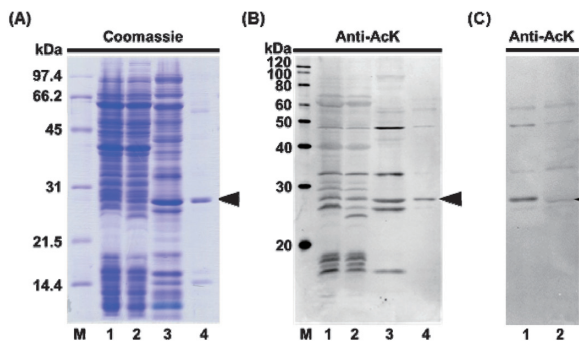


図 10 各精製段階のアセチル化タンパク質の検出
(A), (B) の 1 は粗抽出, 2 は硫酸塩析, 3 は ButylToyopearl, 4 は DEAE-Cellulose による精製を表している。(C) の 1 は最終精製サンプル, 2 は 1+精製 LpSirA+NAD⁺ によって脱アセチル化を行ったサンプル。(B) と (C) は市販 Acetylated-Lysine primary antibody を用いた Western blotting 解析。

paracasei BL23 においてサーチュインはタンパク質合成に関与する事が推測された²⁸⁾。

L. paracasei におけるサーチュイン タンパク質の局在解析

局在解析の第一歩として, 抗 LpSirA 抗体を用いて免疫蛍光染色法を試みた。細胞に Anti-LpSirA antibody および二次抗体として, anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 dye antibody を反応させることで観察を行った。細胞の核様体は Hoechst 33342 で染色を行い, 共焦点顕微鏡 Leica TCS-SP5 Ver11.6 (Leica Microsystems Wetzlar, Germany) を用いて *L. paracasei* における LpSirA の局在観察を行った。その結果, LpSirA が分裂細胞における分裂面と細胞極に局在することが観察された (図 11)。

次に, 固定操作を経ない生細胞における局在情報を得るために, LpSirA-Venus 融合タンパク質を用いた局在観察を行うことにした。*sirA* 遺伝子 (693 bp) は蛍光タンパク質である Venus 遺伝子を含んだ pCS2 plasmid vector へ挿入され, さらに *sirA*-venus 融合遺伝子断片を, pLPM11 plasmid vector に挿入し, この pLPM11 を, エレクトロポレーション法を用いて, *L. paracasei* BL23 に形質転換を行い, LpSirA-Venus 高発現株を作成した。作製した LpSirA-Venus 高発現株は galactose による発現誘導を行った後, 共焦点顕微鏡による LpSirA-Venus タンパク質の局在観察を行った。その結果, LpSirA-Venus タンパク質が細胞質に螺旋のような規則性をもって局在することが観察された (図 12)。この螺旋に沿った局在は免疫電子顕微鏡像で, 更に明確に観察された (図 13)。

枯草菌においては, 分裂面に局在するタンパク質として Z リングを合成する FtsZ が存在する²⁹⁾。細胞極には, 核様体の細胞極への移動を促進させる RacA および, RacA を細胞極につなぐ細胞分裂タンパク質 DivIVA が存在する³⁰⁾。さらに細胞質において螺旋状に局在するタンパク質として, アクチンホモログである MreB タンパク質および FtsZ の重合を阻害する MinC および MinD タンパク質が

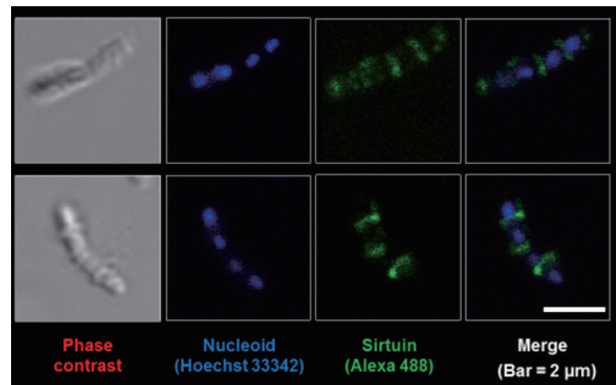


図 11 免疫蛍光染色によるサーチュインタンパク質の局在観察

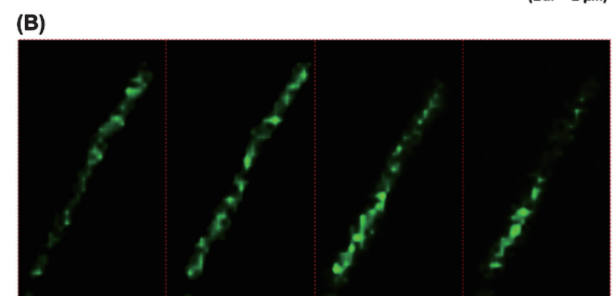
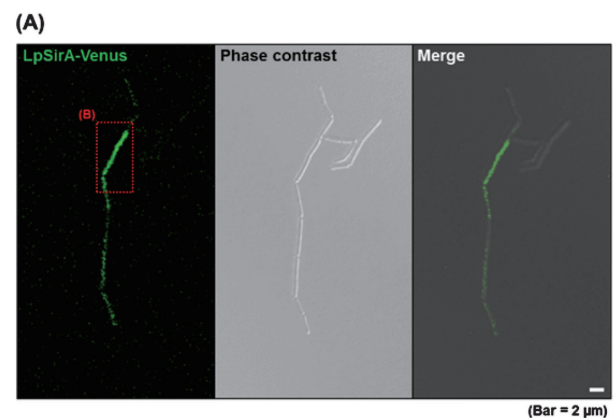


図 12 生細胞における LpSirA-Venus 融合タンパク質の局在観察
(B) は (A) の赤枠で囲んだ部分を拡大し, さらに焦点を少しずつずらして撮影した図である。

存在する^{31,32)}。加えて, 細胞壁合成酵素の一つで, 分裂面において細胞隔壁合成を担当する Penicillin-Binding Proteins 3 (PBP3) に相当する分子量のバンドもサーチュイン標的の一つとして観察された。興味あることに, 当研究室においては, *L. paracasei* の PBP3 (LpPABP3) はコール酸ストレスによりその活性が変わり, 細胞形態にも影響を及ぼすことを示唆するデータを得ている³³⁾。

これらのことから, *L. paracasei* BL23 においてサーチュインは細胞分裂に関与する事が示唆された。

サーチュイン遺伝子の欠損及び過剰発現が 及ぼす表現性状の解析

ここまでの研究で *L. paracasei* にサーチュインが存在し, 脱アセチル化活性を有すること, サーチュインの標的タンパク質として, タンパク質の合成に関与する 30S

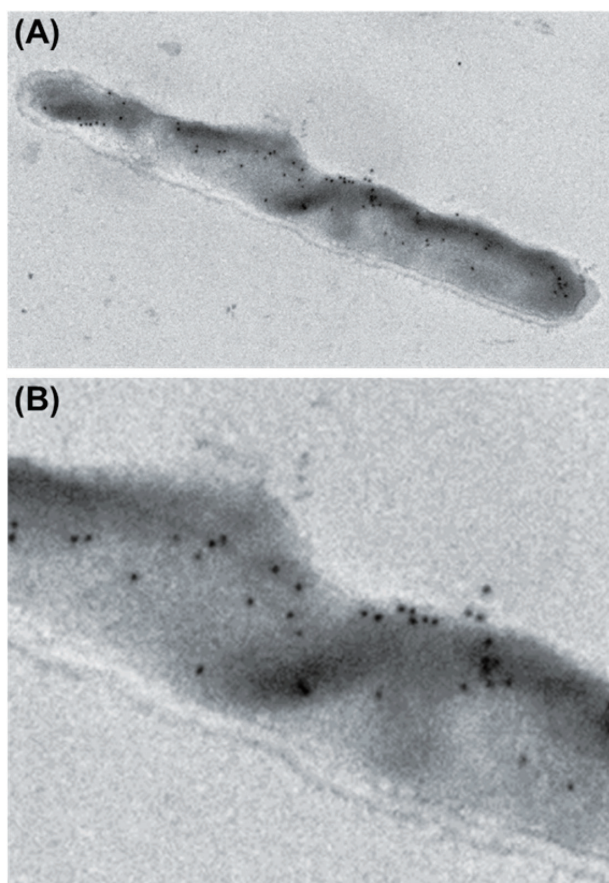


図 13 免疫電子顕微鏡像
(B) は (A) の部分拡大図である。

Ribosomal subunit Protein S4 が存在する事、その局在が細胞分裂関連タンパク質と似ていることを明らかにした。これによりサーチュインが乳酸菌のタンパク質の合成や細胞分裂に関与することが推測された。そこで遺伝解析を展開することにして、サーチュイン遺伝子欠損株（東京農工大学梶川揚申先生作成）およびこちらでサーチュインタンパク質高発現株を作成して、比較する事で、サーチュインの役割について、更なる機能解析を行った。

ここでは *Lactobacillus paracasei* BL23 の野生株（以下、WT）、サーチュイン遺伝子欠損株（以下、*ΔsirA*）およびサーチュインタンパク質高発現株（以下、HE）の3株を用いた。プロテオーム解析として、WT、*ΔsirA*、HE の3株のタンパク質の発現量について比較解析を行った。その結果、菌株ごとに図の赤い矢印で示したような発現量の異なるタンパク質が示された。このことから、サーチュインの量（図14-A）が細胞内の特定のタンパク質の発現レベルに影響を与えることが示唆された（図14-C）。また、菌株ごとのアセチル化レベルの違いを解析するため、抗 Acetylated-Lysine 抗体によるウェスタンブロッティング解析を行った。その結果、予想通り、WT と比べ、*ΔsirA* はタンパク質のアセチル化レベルが全体的に高く、HE はタンパク質のアセチル化レベルが全体的に低いことが示された（図14-B）。

新氏が博士課程をあと半年で終了する見込みが立っている。

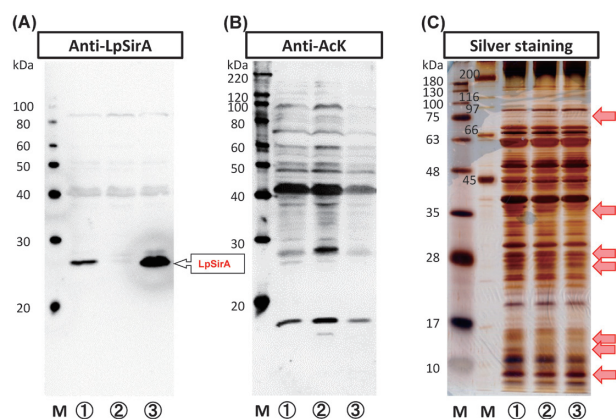


図 14 サーチュインタンパク質の発現量とタンパク質アセチル化レベル及びタンパク質発現量の解析
①は WT, ②は *ΔsirA*, ③は HE の細胞抽出液を示している。(A) は LpSirA の発現量, (B) はアセチル化タンパク質のバンドパターン, (C) はタンパク質の発現量（銀染色）。(C) の赤矢印は各変異株で発現の異なったタンパク質を示している。

たこのころ、フィリピンから国費留学生のグレイゼル・トレスさんが秋入学 PhD コース大学院生として研究室に入ってきた。彼女はそれまで微生物検査の経験を積んでいて、さっそく顕微鏡でこれらの遺伝子変異株の細胞観察を始め、ほどなくして、細胞の長さの変化に気付いた³⁴⁾。

すなわち、WT、*ΔsirA*、HE の3株の細胞形態を観察したところ、興味深いことに HE は WT と比べ長い細胞の割合が多く、*ΔsirA* は WT と比べ、短い細胞の割合が多く観察され、統計処理のためにそれぞれ最低でも100個の細胞の長さを、同じ画面で選別なく総てを解析することで、細胞長の統計解析を行って、これを統計的に有意であると示した（図15）。

そこで薬剤解析に経験を深めていた新氏は、サーチュイン活性の阻害剤である NAM を細胞に反応させて、擬似的なサーチュインの欠損状態にすると HE の細胞の長さは短くなるのか解析を行った。その結果は目論見通り、HE の細胞長は *ΔsirA* 並みに短くなり、一方、サーチュイン遺伝子の存在しない *ΔsirA* では NAM の影響はなかった（図16）。このことからサーチュインが細胞形態に関与することが強く示唆された。

次なる設問として、この細胞形態の変化が細菌の分裂速度に影響を与える（あるいは速度が変化するので形態が変わる）のではないかと考え、WT、*ΔsirA*、HE の3株の細胞分裂速度を、生菌数を計測することによって解析した。その際に細胞形態を観察する際に用いた NAM で処理をした細胞の分裂速度も解析項目に加えた。その結果、*ΔsirA*、WT、HE の順に分裂速度が速い傾向を示し、更に NAM を添加して培養することで、WT、HE の細胞分裂速度は *ΔsirA* と同程度に速くなることが示された（図17）。このことからサーチュインを仲介することで菌の分裂速度を制御できる可能性も浮上し、乳製品や醗酵食品の生産調節にサーチュイン研究が貢献できるのではないかと考えている。

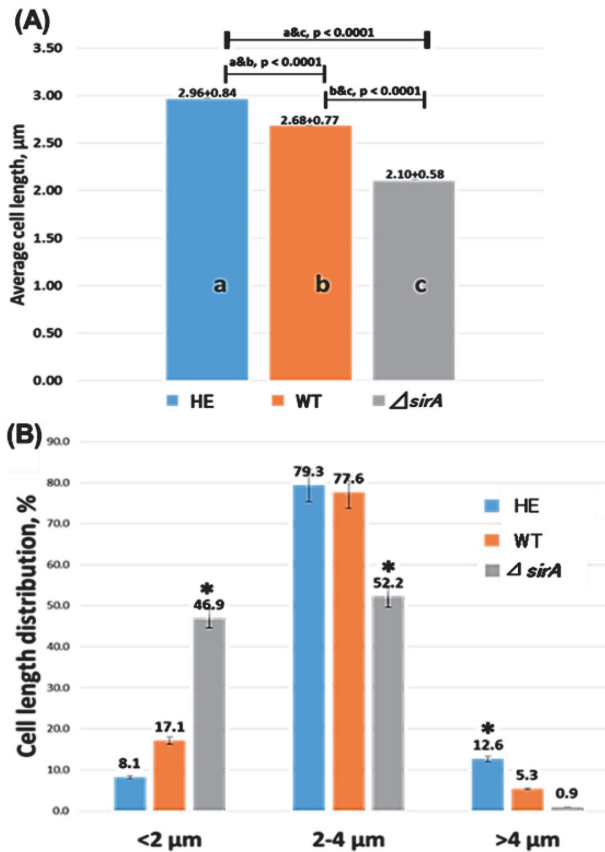


図 15 平均細胞長と細胞長の割合の解析
(A) は平均細胞長, (B) は細胞長の割合。

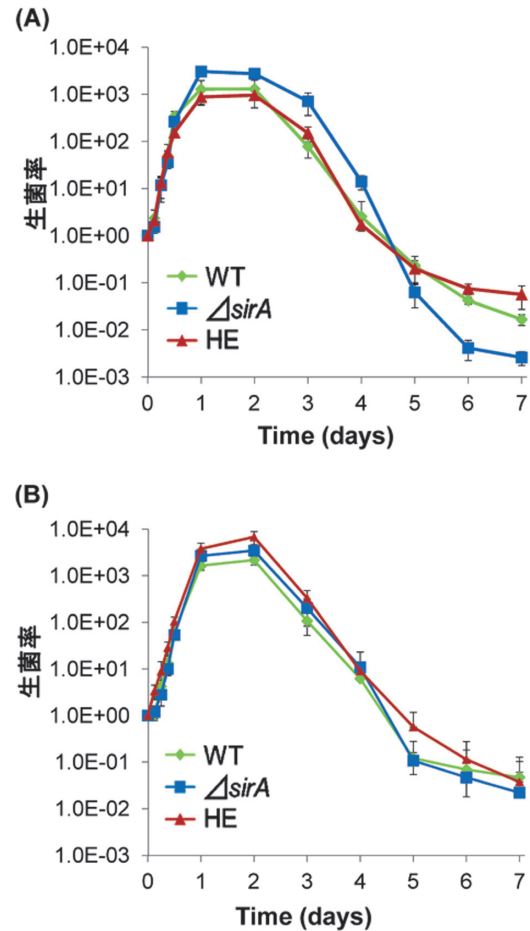


図 17 細胞分裂速度の解析
(A) は無処理, (B) NAM 処理を行った各菌株の生菌率。

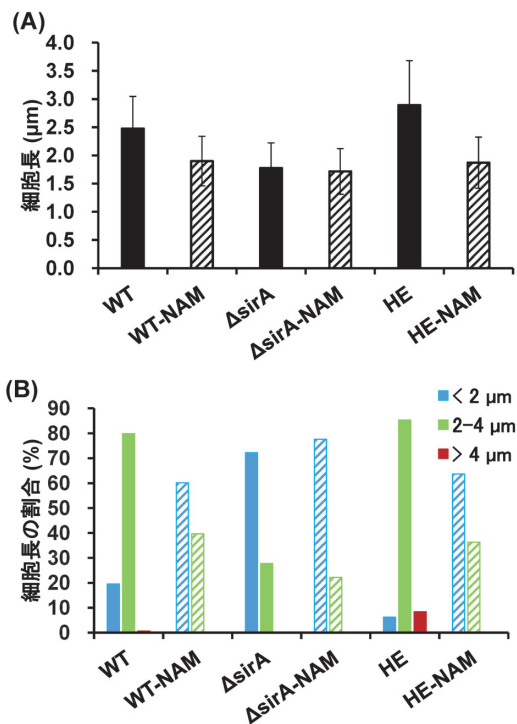


図 16 NAM 存在下における平均細胞長と細胞長の割合
(A) は平均細胞長, (B) は細胞長の割合。

更に、細菌のストレス耐性能試験として、高塩濃度ストレス、酸ストレス及び高温ストレス条件下における WT, *ΔsirA*, HE の 3 株の生存率について解析を行った。その結果、3 株の生存率は高温、酸両ストレスに対して HE, WT, *ΔsirA* の順に高く、逆に高塩濃度ストレスに対しては、*ΔsirA*, WT, HE の順に生存率が高い結果となった。このことから細菌のストレス耐性能はサーチュインが高いレベルで存在する事によって強くなるとは限らず、ストレス条件によってサーチュインの有用性が異なるという事が考えられた。中でも酸耐性について着目すると、乳酸菌は自身の生産する乳酸で弱ってしまうという事態に対して、サーチュインが関与するとすれば、何か有用な仕掛けができないかとも連想を膨らませる。しかし、このままでは長年行ってきた乳酸菌のストレス耐性能へのサーチュインの関与について明確な答えが出ないままであるので、今後様々なストレス条件下で解析を行い、ストレス毎の共通点を発見することが必要であると考えている。

おわりに

ゲノム情報解析から大部分の乳酸菌にサーチュイン遺伝子が存在する事、および *L. paracasei* 3 株のサーチュインが実際に脱アセチル化酵素活性を持つことを見いだした。

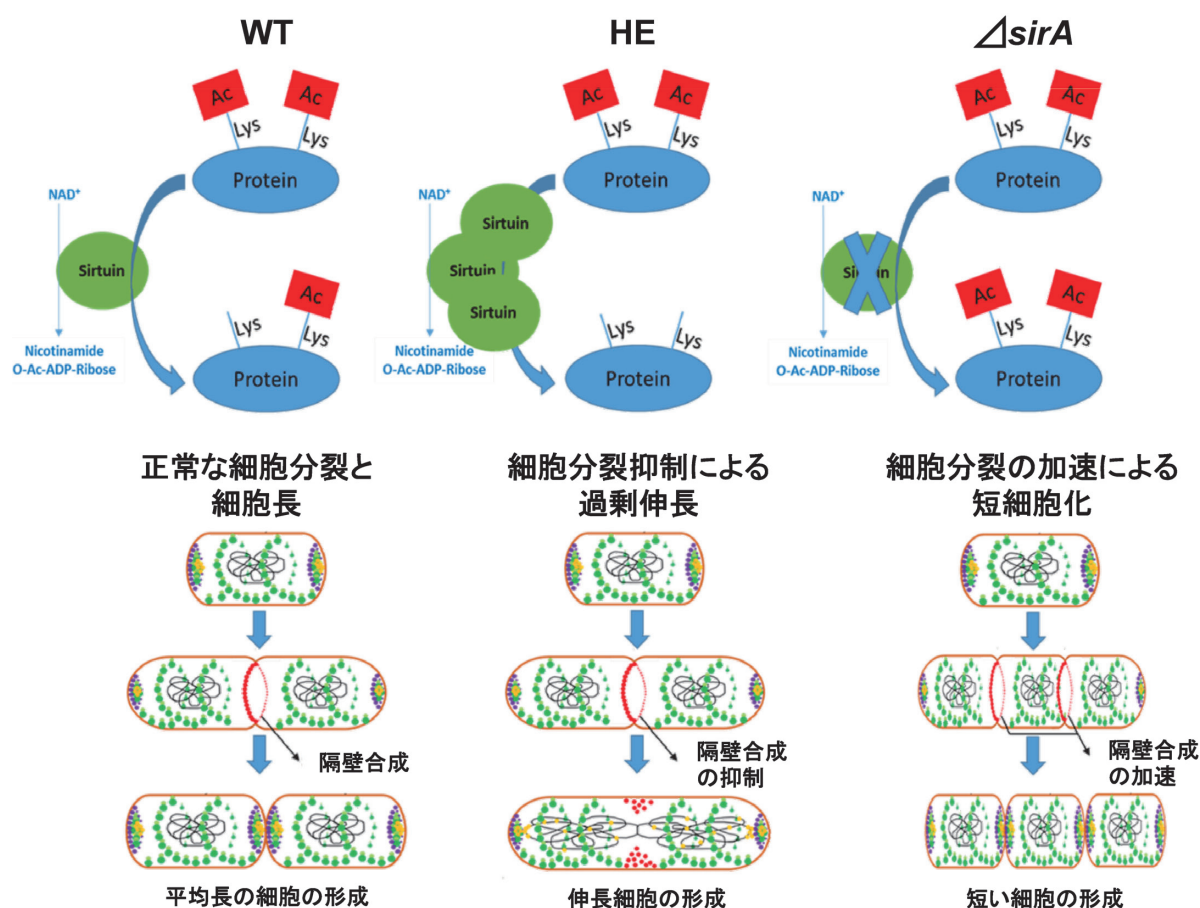


図 18 サーチュインの発現量と細胞分裂速度および細胞長の関係

これに加えて、*L. paracasei* BL23 における LpSirA の標的タンパク質がタンパク質合成に関与する 30S ribosomal protein S4であることを、世界で初めて明らかにした。更に、免疫蛍光染色により、LpSirA タンパク質は分裂細胞における分裂面と細胞極に局在する事、およびLpSirA-Venus 高発現株の観察と顕微鏡撮影により、LpSirA タンパク質は細胞質に螺旋のような規則性をもって局在する事も観察された。プロテオーム解析により、サーチュインはタンパク質の発現に影響を及ぼすことが示唆され、細胞分裂速度計測により、細胞分裂にも関与し、更にストレス耐性能試験により菌のストレス応答能に関与することが考えられた。これらの事を考え合わせると、サーチュインの役割として、ストレス応答や細胞分裂を含めた、タンパク質の合成制御が考えられる。以上より、結論として、*L. paracasei* におけるサーチュインの役割として、タンパク質合成制御と細胞分裂制御、ストレス耐性に関与する事を推測した。これを模式的に表したのが、図 18 である。それ故、サーチュインの働きに着目することで、あるいは、乳酸菌とサーチュインの発現や活性を調節する化合物と組み合わせることで、将来より機能性の高いプロバイオティクスとして、人々の健康増進に貢献できる乳酸菌の選定に、サーチュインという新しい観点からの基準を見出す可能性があると考えている。たとえば、乳酸菌のサーチュイン発現を促進するような作用のプロバイオティクスのような食品と共存させるこ

とでもプロバイオティクス機能が上がるとすれば有用なのではないかと想像している。そのような化合物を探索すべく、レポーター遺伝子を内在性の *sirA* 遺伝子プロモーター配列と結合した遺伝子断片を組み込んだ細胞も作成できおり、これを用いた化合物探索も次なる課題である。

ところで、哺乳動物ではサーチュインは、概日リズムの適正な維持に関わって、老化の速度を緩やかにするとされている³⁵⁾。こうしたリズムは乳酸菌では研究例がないと思われるが、本研究で示された細胞の長さが変わるという事象は、本来細胞がもっている細胞周期性が変化した結果だとすれば、*sirA* 高発現株が長くなったことも、「乳酸菌の老化」ということに関係しているのかもしれない。長寿遺伝子というキーワードがとうとう乳酸菌と繋がったようでもあり、興味深い。更には宿主の概日リズムと腸内乳酸菌の細胞周期リズムにはクロストークがあるのか、などと想像すると、乳酸菌は人が寝ている間に腸の蠕動を促進するとされることが、睡眠の質に関わる腸脳相関との関連もまんざら偶然ではないのかもしれない。

さらに、有核生物であれだけ劇的な作用を示している遺伝子発現制御ということに、原核細胞のサーチュインは（たとえ染色体構造がないにしても）何らかの進化的な原点を持っていはいしまいか、ということも残された大切な設問である。そこにヒントを得るべく、RNAseq という手法を用いた解析を最近農大ゲノムセンターで行ってもらった

が、その解析は進行中である。

乳酸菌と腸を持つ高等生物の共同的な進化はとてつもなく長い時間を経て現時点に至っていると考えられるが、その共進化をサーチチェーンに着目して、人によってオーダーメイドに出来るように発展できれば、健康長寿社会にも役立つであろうし、人だけでなく、家畜や、場合によっては有用昆虫などにも応用できるのではないかと、夢は広がるのであるが、その実現は一つの研究室だけでは難しい。今後共生細菌のサーチチェーンに興味をもってくれる研究者がふえることを願っている。

謝辞：本研究は、およそ10年間東京農業大学オホーツクキャンパスの応用微生物学研究室で展開されてきたもので、当初から学部・大学院（修・博）・ポストドク研究員としてほぼ全体に関わった新穂高氏の頑張り、さらに、後半3年間に重なった博士後期課程国費留学生のグレイゼル・バレード・トーレスさんの頑張りがなければ進められなかったもので、まずこの二人の労を多として感謝します。また修士課程で粘り強く実験を繰り返した服部正寛、権田拓弥の両君も貢献してくれました。他に、全員の名前を上げられませんが、彼等を補佐して頑張った多くの学部生の皆さんにも感謝します。もとより科学研究は一つの研究室だけでは限界があります。開始期のゲノム探索に関わってくれた田中尚人、志波優の両先生、菌株の分与と相談にのってくださった岡田早苗名誉教授に感謝します。そして、本テーマが農大戦略プロジェクトに採択されて支援をうけた2015—2018年の間、貴重な欠損株やレポーター株を次々に作成してくれた梶川揚申先生、電子顕微鏡で素晴らしい画像を撮影してくださった東京大学の平田愛子先生、標的探索のためのアミノ酸配列決定を担当してくれた川崎信治先生と、理化学研究所/東京薬科大学の伊藤昭博先生、そして疏水カラムを用いたタンパク質精製の秘訣を伝授してくれた新村洋一先生に深く感謝します。Venus 遺伝子を快く譲渡してくれた理化学研究所の宮脇敦史先生に感謝します。本研究の途中から研究室の同僚若手教員として乳酸菌の専門家である遠藤明仁先生が着任して、さまざまな乳酸菌の研究手法や考え方を私たちに指導してくれたことは大変ありがたかったことは、特記して感謝いたします。また開始段階で、発展の予測もつかなかった時期に支援していただいたカゴメ株式会社にもこの場を借りて御礼申し上げます。そして、前職・大正製薬創薬研究所時代に、私を脱アセチル化酵素の世界に誘ってくれたのは、抗真菌剤トリコスタチン A が HDAC 阻害活性を持つことを発見した理化学研究所/東京大学の吉田稔先生でした。当時医薬品機構の大型プロジェクトに、九州工業大学の西野憲和先生や熊本大学の荒木栄一先生と共に参加させてくれたことがきっかけで、私は創薬や健康維持における脱アセチル化反応の意義の研究に身を投じ、農大に移ってからは、HDAC の中でも善玉といわれるⅢ型脱アセチル化酵素であるサーチチェーンをテーマに選びました。この他名前を上げられなかった方々も含めて、本研究を物心ともに支えてくれた農大関係者他の皆さんに感謝します。

参考文献

- 1) IMAI S, ARMSTRONG CM, KAEBERLEIN M, GUARENTE L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. **403** : 795-800.
- 2) Matt KAEBERLEIN, Thomas McDONAGH, Birgit HELTWEG, Jeffrey HIXON, Eric A. WESTMAN, Seth D. CALDWELL, Andrew NAPPER, c Rory CURTIS, Peter S. DiSTEFANO, Stanley FIELDS, Antonio BEDALOV, and Brian K. KENNEDY (2005) Substrate-specific Activation of Sirtuin by Resveratrol *Journal of Biological Chemistry* **280** : 17038-17045
- 3) LIN SJ, DEFOSSEZ PA, GUARENTE L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **289** : 2126-2128.
- 4) HOWITZ KT, BITTERMAN KJ, COHEN HY, LAMMING DW, LAVU S, WOOD JG, ZIPKIN RE, CHUNG P, KISIELEWSKI A, ZHANG LL, SCHERER B, SINCLAIR DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. **425** : 191-196.
- 5) COHEN HY, MILLER C, BITTERMAN KJ, WALL NR, HEKKING B, KESSLER B, HOWITZ KT, GOROSPE M, de CABO R, SINCLAIR DA. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. **305** : 390-392.
- 6) KANFI Y, NAIMAN S, AMIR G, PESHTI V, ZINMAN G, NAHUM L, BAR-JOSEPH Z, COHEN HY. (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*. **483** : 218-221.
- 7) SAKA K, IDE S, GANLEY AR, KOBAYASHI T. (2013) Cellular senescence in yeast is regulated by rDNA noncoding transcription. *Curr Biol*. **23** : 1794-1798.
- 8) GRAY SG, EKSTRÖM TJ. (2001) The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res*. **262** : 75-83.
- 9) De RUIJTER AJ, van GENNIP AH, CARON HN, KEMP S, van KUILENBURG AB. (2003) Histone deacetylases (HDACs) : characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. **370** : 737-749.
- 10) LI R, GU J, CHEN YY, XIAO CL, WANG LW, ZHANG ZP, BI LJ, WEI HP, WANG XD, DENG JY, ZHANG XE. (2010) CobB regulates *Escherichia coli* chemotaxis by deacetylating the response regulator CheY. *Mol. Microbiol*. **76** : 1162-1174.
- 11) GARDNER JG, ESCALANTE-SEMERENA JC. (2009) In *Bacillus subtilis*, the sirtuin protein deacetylase, encoded by the *srtN* gene (formerly *yhdZ*), and functions encoded by the *acuABC* genes control the activity of acetyl coenzyme A synthetase. *J. Bacteriol*. **191** : 1749-1755.
- 12) ABOU-ELFETOUH A, KUHN ML, HU LI, SCHOLLE MD, SORENSEN DJ, SAHU AK, BECHER D, ANTELMANN H, MRKSICH M, ANDERSON WF, GIBSON BW, SCHILLING B, WOLFE AJ. (2015). The *E. coli* sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate sites. *Microbiology Open* **4** (1) : 66-83.
- 13) FAO/WHO Working Group. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food
- 14) CLEMENTE JC, URSELL LK, PARFREY LW, KNIGHT R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health : an integrative view. *Cell*. **148** : 1258-70.
- 15) GOLDIN BR, GORBACH SL. (2008) Clinical indications for probiotics : an overview. *Clin Infect Dis*. **46** : S96-100, S144-51.
- 16) ISOLAURI E, ARVOLA T, SÜTAS Y, MOILANEN E, SALMINEN S. (2000) Probiotics in the management of atopic eczema.

- Clin Exp Allergy*. **30** : 1604-1610.
- 17) SAKAMOTO I, IGARASHI M, KIMURA K, TAKAGI A, MIWA T, KOGA Y. (2001) Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother*. **47** : 709-710.
- 18) CLEVELAND J, MONTVILLE TJ, NES IF, CHIKINDAS ML. (2001) Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*. **71** : 1-20.
- 19) MATSUDA T, FUJIMURA S, SUDA H, MATSUFUJI Y, NAKAGAWA J. (2011) Alteration of ethanol tolerance caused by the deficiency in the genes associated with histone deacetylase complex in budding yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **75** : 1829-1831.
- 20) TRAPP J, MEIER R, HONGWISET D, KASSACK MU, SIPPL W, JUNG M. (2007) Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins). *ChemMedChem*. **2** : 1419-1431.
- 21) SHIWA Y, ATARASHI H, TANAKA N, OKADA S, YOSHIKAWA H, ENDO A, MIYAJI T, NAKAGAWA J. (2015) Genome Sequences of Three Strains of *Lactobacillus paracasei* of Different Origins and with Different Cholate Sensitivities. *Genome Announc*. **3** : e00178-15.
- 22) CAO D, WANG M, QIU X, LIU D, JIANG H, YANG N, XU RM. (2015) Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. *Genes Dev*. **29** : 1316-1325.
- 23) HUBBARD BP, GOMES AP, DAI H, LI J, CASE AW, CONSIDINE T, RIERA TV, LEE JE, E SY, LAMMING DW, PENTELUTE BL, SCHUMAN ER, STEVENS LA, LING AJ, ARMOUR SM, MICHAN S, ZHAO H, JIANG Y, SWEITZER SM, BLUM CA, DISCH JS, NG PY, HOWITZ KT, ROLO AP, HAMURO Y, MOSS J, PERNI RB, ELLIS JL, VLASUK GP, SINCLAIR DA. (2013) Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science*. **339** : 1216-1219.
- 24) AVALOS JL, CELIC I, MUHAMMAD S, COSGROVE MS, BOEKE JD, WOLBERGER C. (2002) Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol. Cell*. **10** : 523-535.
- 25) TANG CK, DRAPER DE. (1990) Evidence for allosteric coupling between the ribosome and repressor binding sites of a translationally regulated mRNA. *Biochemistry*. **29** : 4434-4439.
- 26) MAYERLE M, WOODSON SA (2013) Specific contacts between protein S4 and ribosomal RNA are required at multiple stages of ribosome assembly. *RNA*. **19** : 574-585.
- 27) YANG Y, CIMEN H, HAN MJ, SHI T, DENG JH, KOC H, PALACIOS OM, MONTIER L, BAI Y, TONG Q, KOC EC. (2010) NAD⁺-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10. *J. Biol. Chem*. **285** : 7417-7429.
- 28) ATARASHI H, KAWASAKI S, NIMURA Y, TANAKA N, OKADA S, SHIWA Y, ENDO A and NAKAGAWA J. (2016) Identification of Sirtuin and its target as the ribosomal protein S4 in *Lactobacillus paracasei*. *J Gen Appl Microbiol*. **62** (2) : 98-105
- 29) GREGORY JA, BECKER EC, POGLIANO K. (2014) *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev*. **22** : 3475-3488.
- 30) BEN-YEHUDA S, RUDNER DZ, LOSICK R. (2003) RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*. **299** : 532-536.
- 31) BARÁK I, MUCHOVÁ K, WILKINSON AJ, O'TOOLE PJ, PAVLENDOVÁ N. (2008) Lipid spirals in *Bacillus subtilis* and their role in cell division. *Mol Microbiol*. **68** : 1315-1327.
- 32) JENSEN SO, THOMPSON LS, HARRY EJ. (2005) Cell division in *Bacillus subtilis* : FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J Bacteriol*. **187** : 6536-6544.
- 33) HATTORI M, TORRES GA, TANAKA N, OKADA S, ENDO A, NAKAGAWA J. (2017). Detection and analysis of *Lactobacillus paracasei* penicillin-binding proteins revealed the presence of cholate-sensitive penicillin-binding protein 3 and an elongated cell shape in a cholate-sensitive strain. *Biosci Microbiota Food Health* **36** (2) : 65-72.
- 34) TORRES-BARREDO GA, ATARASHI H, KAJIKAWA A, HIRATA A, ENDO A, NAKAGAWA J. (2018). Intracellular localization of sirtuin and cell length analysis of *Lactobacillus paracasei* suggest possible role of sirtuin in cell division and cell shape regulation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **82** (5) : 916-825.
- 35) CHANG HC, GUARENTE L. (2013) SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell* **153** (7) : 1448-1460

Unraveling the Fundamental Function of the Lactic Acid Bacterial Longevity Gene, Sirtuin : Regulation of Protein Synthesis and Cell Division

By

Junichi NAKAGAWA^{*†}

(Received November 22, 2018/Accepted December 7, 2018)

Summary : Sirtuin is known as a longevity gene that supports long and healthy life, and most organisms have this gene. In eukaryotes, it works mainly as an NAD⁺-dependent protein lysine deacetylase, which removes acetyl groups from proteins such as histones, p53 and others. Whereas in prokaryotes it was first identified as *cobB* which plays a role in cobalamin processing, later it was reported to deacetylate certain metabolic enzymes, transcription factors and chemotactic proteins. Although lactic acid bacteria also have this gene, little is known about its function in the bacteria. 'Does sirtuin also function as a longevity or health-promoting gene in lactic acid bacteria?' This question was the starting point of our research. *Lactobacillus paracasei*, widely used as probiotics and a fermented food starter, was chosen, and its sirtuin gene was cloned and recombinant protein, LpSirA, was produced. Subsequently, deacetylase activity of LpSirA was demonstrated and, furthermore, one of the endogenous substrates was identified as 30S ribosomal protein S4. Next, antibody raised against LpSirA was used to analyze intracellular localization of this protein through immuno-staining, observation of living cells harboring sirA-Venus fusion gene, and finally immunoelectron microscopic observation. It was revealed that it localizes either as a loose spiral throughout cell length or a sharp ring at cell division plates and cell poles. Upon generating deletion mutant (Δ *sirA*) and highly expressing cells (HE), it was revealed that Δ *sirA* has shorter cell length, and conversely, HE has longer cell length as compared to the wild type strain. These results indicate that sirtuin plays a role in the regulation of protein synthesis and, further, in the regulation of cell division and cell shape, which are very fundamental to cellular life function. Moreover, it was shown to function in certain stress responses. Together, it provokes the idea that if the control of sirtuin expression levels or function can be artificially manipulated, it may offer a new way to improve probiotic merits of lactic acid bacteria, which in turn, may contribute to promoting long and healthy life for the host organisms.

Key words : sirtuin, lactic acid bacteria, acetylated protein, intracellular localization, protein synthesis, cell division

^{*} Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture

[†] Corresponding author (E-mail : j3nakagawa@gmail.com)