

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780074

研究課題名（和文） Spx 蛋白質を介した乳酸菌の酸素分圧応答機構の解明

研究課題名（英文） Spx-dependent oxygen sensing mechanism in lactic acid bacteria

研究代表者

山本 裕司（YAMAMOTO YUJI）

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：10453507

研究成果の概要（和文）：

本研究では、乳酸菌の一種口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* を材料として RNA ポリメラーゼ結合タンパク質である Spx 分子を介した酸素応答機構の解析を行った。*S. mutans* は 2 つの Spx ホモログ (SpxA, SpxB) を持つが、両蛋白とも分子内のシステイン残基が酸化されると RNA ポリメラーゼの α サブユニットに対する結合能が上昇した。また、Spx 分子の分解系について検討を行った結果、SpxB の分解は ClpXP プロテアーゼ複合体に依存していること、一方 SpxA は ClpXP による分解を受けず、その細胞内濃度が常に一定であった。しかし、細胞内の SpxB 濃度が上昇しても、抗酸化蛋白質の発現様式に影響は認められなかった。以上より、*S. mutans* の Spx においては、細胞内の Spx 分子の濃度変化というよりは分子内のシステイン残基の酸化が酸素分圧の感知に重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we analyzed Spx-dependent oxygen sensing mechanism of *Streptococcus mutans*. Spx is a RNA-binding protein originally identified in *Bacillus subtilis*. Both SpxA and SpxB of *S. mutans* were shown to more strongly bind to alpha-subunit of RNA polymerase when cysteine residues of these proteins were oxidized. Analysis of cellular Spx degradation pathway demonstrated that SpxB was degraded by ClpXP protease complex while cellular SpxA concentrations were constant and not affected by ClpXP protease. Increased concentrations of SpxB in *clpP* or *clpX* mutant didn't affect the expression profile of antioxidative proteins. These results indicated that the oxidation of cysteine residues of Spx, rather than cellular Spx concentrations, might play a critical role in oxygen sensing of *S. mutans*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物制御、発現制御、乳酸菌、酸素、活性酸素、連鎖球菌

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌は糖源を資化して乳酸を産生する菌の総称であり、人間や動物の腸管をはじめとして自然界に広く分布する。乳酸菌には発酵食品の製造に用いられる産業上の有用菌から人畜に感染症を引き起こす病原性連鎖球菌までが含まれ、有用・有害の両面から人類の生活に深くかかわる重要な菌群である。

乳酸菌は呼吸鎖やカタラーゼを持たず、嫌氣的発酵によってエネルギーを獲得するため嫌氣的な生物として扱われてきた。しかしながら、近年申請者をはじめとする幾つかの研究グループにより、乳酸菌にも独自の酸素の利用系や抗酸化メカニズムが存在することが明らかとなってきた。これらの知見は、有用乳酸菌の代謝改変、呼吸代謝を利用した効率的な培養法の確立、あるいは製造過程で酸素濃度を制御することによる新たな培養法の開発などに現在利用されている。一方、ヒトや動物の消化管における乳酸菌の適応機構にも、好気代謝能や抗酸化酵素が重要な役割を演じていることが明らかとなりつつある。しかしながら、適応に最も重要である「環境中の酸素分圧を認識して応答する仕組み」については、そのほとんどが不明である。乳酸菌がどのように酸素分子を認識しているか解明することは、上述したように、新たな乳酸菌の育種、培養法の開発、宿主内での適応機構の理解のために非常に重要と考えられる。

2. 研究の目的

これまでに我々は、乳酸菌の一種である口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* において、抗酸化蛋白質の酸素による誘導に関与する制御因子として、RNA ポリメラーゼ結合タンパク質である SpxA 及び SpxB 両分子を同定している。spxA, spxB 両遺伝子欠損株では、抗酸化蛋白質の発現が大きく低下することから、両 Spx 蛋白質が抗酸化因子の発現に必要なことは明らかとなっているが、どのように酸素分圧の変化が認識されているのは不明であった。本研究では、*S. mutans* における Spx を介した酸素分圧応答機構の解明を目的として、1) RNA ポリメラーゼと Spx の相互作用の解析、2) 生体内における Spx の分解系の探索、3) Spx 分子を酸化する因子の探索を行った。

3. 研究の方法

S. mutans の SpxA および SpxB と RNA ポリメラーゼの相互作用を解析するために、各蛋白質の構造遺伝子を pET28b ベクターに組み込み、his-tag 融合蛋白質として発現させ、ニッケルカラムで精製した。RNA ポリメラーゼについては、枯草菌で Spx と結合すると報

告されている α サブユニットとその C 末端領域のみを発現させた 2 つの組み換えタンパク質を調製した。SpxA, SpxB と α サブユニットの相互作用の解析には Biacore を用いた。

S. mutans における SpxA と SpxB 分解系の探索を目的として、分解に関与すると推定される ClpXP プロテアーゼの欠損株を作製した。プロテアーゼの構成因子である *clpP* および *clpX* にエリスロマイシン耐性遺伝子を導入したノックアウトベクターを作製し、2 点相同組換えで、染色体上の遺伝子を不活化させた。作製した欠損株における SpxA, SpxB、及び各抗酸化蛋白質 (SOD, Dpr, AhpC, Nox-1, Nox-2) の発現様式をウエスタンブロッティングで解析した。

SpxA および SpxB のシステイン残基を酸化する因子を探索するため、精製した蛋白質を還元し嫌気箱内で緩衝液を置換した後、過酸化水素、酸素、diamide との反応性を評価した。各試薬処理後のシステイン残基の酸化還元状態は、チオール試薬である AMS で還元型の Spx 蛋白質をラベルすることで、評価した。

4. 研究成果

枯草菌の Spx は、RNA ポリメラーゼの α サブユニットに結合することで RNA ポリメラーゼの転写特性に影響を与え、グローバルに転写を制御すると報告されている。Spx はグラム陽性細菌に広く局在しているものの、枯草菌以外では蛋白質の解析を行った報告はなく、他のグラム陽性細菌における機能の詳細は知られていない。今回我々は、*S. mutans* の SpxA および SpxB 組み換えタンパク質を精製し、RNA ポリメラーゼの α サブユニットとの結合特性を解析した。その結果、SpxA, SpxB 両蛋白質ともに RNA ポリメラーゼ α -サブユニットと結合すること、さらに両分子とも酸化型の方がより強固に RNA ポリメラーゼに結合することが明らかとなった。枯草菌では、チオレドキシシンなど幾つかの遺伝子の発現に Spx 分子内のシステイン残基の酸化が必要であると報告されている。しかしながら、Spx 分子の酸化還元状態は RNA ポリメラーゼへの結合能には影響を与えないと報告されており、*S. mutans* においては分子内の酸化・還元状態の変化がより重要な役割を持つ可能性が示唆された。

次に *S. mutans* における SpxA および SpxB 蛋白質の分解系について探索を行った。枯草菌では、ClpXP プロテアーゼ複合体により通常時は Spx が分解され、その細胞濃度が低く保たれていることが知られており、酸化ストレスにより ClpXP による分解が低下すると細胞内の Spx 濃度が上昇する。すなわち、細胞内 Spx 濃度の変化がレギュロンを制御する重要な要因となっている。*S. mutans* にも ClpXP

プロテアーゼのホモログが存在することから、*clpX* および *clpP* 遺伝子の欠損株を作製し、細胞内の SpxA および SpxB の濃度の変化を嫌気・好気両条件下で解析した。その結果、SpxA の濃度は *clpP*、*clpX* 欠損株においても変化が見られず、酸素の有無に関わらず一定であった。一方、SpxB の濃度は酸素によって誘導され、*clpP* あるいは *clpX* の欠損によっても大きく増加した。すなわち、SpxA の分解は ClpXP に依存せず、その細胞内濃度は常に一定であったが、SpxB の分解は ClpXP に依存的であり、酸素の存在によってもその細胞内濃度は増加した。続いて、両 *clpP* 及び *clpX* 欠損株における各抗酸化蛋白質の発現を解析した。その結果、好気・嫌気条件下における抗酸化蛋白質の発現様式は野生株と同様であり、変化は認められなかった。このため、SpxB の細胞内濃度が上昇しても発現には影響がないと考えられた。

以上の2つの実験により、*S. mutans* においては Spx 分子内のシステイン残基の酸化が酸素分圧の感知に重要な役割を持つと考えられた。そこで続いて、システイン残基を直接酸化する分子種の探索を行った。還元型の SpxA および SpxB 両蛋白質を嫌気箱内で調製し、過酸化水素、酸素、diamide で処理したところ、システイン残基は過酸化水素と diamide で速やかに酸化されたが、酸素との反応性は低く、大気下で Spx 分子が酸化されるには1時間程度を要した。この結果は、酸素分子自身が Spx の直接的な酸化因子というよりは、過酸化水素のような他の分子が直接システイン残基の酸化に寄与している可能性を示唆している。今後、SpxA、SpxB のシステイン残基をセリンに置換した変異株の作製など、システイン残基の反応性と役割に注目して解析を行うことで、Spx 分子を介した酸素分圧応答機構が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① 山本裕司

プロバイオティクスとして用いられる微生物の低温保存時の挙動と生残性に影響を与える要因

日本冷凍空調学会誌冷凍 86(1002), 317-322, 2011.4 (総説)

[学会発表] (計2件)

- ① 安部達也、鈴木聡美、山本裕司、向井孝夫. 口腔内連鎖球菌における酸素感知機構の解析. 2011年8月26日. 日本畜産学会114回大会. 十和田

- ② 山本裕司、鈴木聡美、安部達也、向井孝夫. 口腔内連鎖球菌の酸素分圧応答に関与する Spx 蛋白質の制御機構の解析. 2011年3月26日. 日本農芸化学会2011年度大会. 京都.

[図書] (計3件)

- ① Yuji Yamamoto, Philippe Gaudu and Alexandra Gruss. Oxidative Stress and Oxygen Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research (edited by Kenji Sonomoto and Atsushi Yokota), Caister Academic Press, p91-102, 2011.7
- ② Bénédicte Cesselin, Aurélie Derré-Bobillot, Annabelle Fernandez, Gilles Lamberet, Delphine Lechardeur, Yuji Yamamoto, Martin Bastian Pedersen, Christel Garrigues, Alexandra Gruss and Philippe Gaudu. Response of lactic acid bacteria to oxidative stress in Stress Responses of Lactic Acid Bacteria (Edited by Effie Tsakalidou Konstantinos and Papadimitriou), Springer-Verlag Press, p111-128, 2011.8.
- ③ 山本裕司. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス. 2章-1-2 乳酸菌・ビフィズス菌の細胞表層タンパク質と提示機構 (p105-112) および 2章 7-1 乳酸菌における酸素ストレス応答 (p213-217) 担当. 日本乳酸菌学会編. 京都大学学術出版会. 2010.11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 裕司 (YAMAMOTO YUJI)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号: 22780074