

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580086

研究課題名（和文） 嫌気性細菌で発見された未知の酸素代謝機構と酸素毒性防御機構の解明

研究課題名（英文） Identification and characterization of novel systems for oxygen metabolism and anti-oxidative stress protection in anaerobes

研究代表者

川崎 信治（Shinji Kawasaki）

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50339090

研究成果の概要（和文）：絶対嫌気性菌の  $O_2$  感受性機構の解明を目的とした。供試菌に用いたブタノール生産菌 *Clostridium acetobutylicum* は、 $O_2$  の存在を瞬時に感知し、複数の  $O_2$  応答性遺伝子を協奏的に高発現する。本研究では機能未知の  $O_2$  応答遺伝子産物を精製し、それらが  $O_2$  と活性酸素を瞬時に消去する酵素複合体として機能することを明らかにした。ビフィズス菌は  $O_2$  下で過酸化水素（ $H_2O_2$ ）を培地中に蓄積し生育が阻害される。ビフィズス菌 *B. bifidum* から  $O_2$  感受性の原因酵素を精製し、b-type DHOD と同定した。解析の結果、好気生育阻害への関与が推定された。

研究成果の概要（英文）：Our purpose is to know the mechanism of  $O_2$  sensitivity of the obligatory anaerobes *Clostridium* and *Bifidobacterium*. *Clostridium acetobutylicum*, which is well known as an efficient acetone-butanol fermenting bacteria, senses the contamination of  $O_2$  in the growth environments quickly and expresses the  $O_2$  responsive genes. In this study, we investigated the function of  $O_2$ -responsive *nror* operon enzymes by purification of the proteins and characterization of their enzymatic activity. We propose that the obligate anaerobe *C. acetobutylicum* possesses an efficient multi-enzyme complex that can scavenge  $O_2$  and ROS using NROR as a master electron donor protein. The primary factor responsible for aerobic growth inhibition of *Bifidobacterium* species is proposed to be the production of  $H_2O_2$  in the growth medium. A  $H_2O_2$ -forming NADH oxidase was purified from  $O_2$ -sensitive *Bifidobacterium bifidum* and was identified as a b-type DHOD. The kinetic parameters suggested that the enzyme could be involved in  $H_2O_2$  production in highly aerated environments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：嫌気性菌・抗酸化酵素・活性酸素・酸素毒性・*Clostridium*・*Bifidobacterium*・腸内細菌

### 1. 研究開始当初の背景

近年、余剰汚泥等の産業廃液の増加やファーストフードに代表される食環境の悪化に伴い、その浄化役である有用嫌気性菌への期待が日増しに増大している。また未利用バイオマスのバイオエネルギー変換や有機資源化の分野においても将来の主役的役割が囑望されている。しかし嫌気性菌はO<sub>2</sub>に感受性を示すことから、O<sub>2</sub>存在下では取り扱いの難しい難培養微生物として一般に認識されており、その応用的な利用には高コストな嫌気設備の建設や食品の無酸素包装技術が必要とされている。

微生物学の教科書には、嫌気性菌はO<sub>2</sub>に対し致死的で、カタラーゼやSODなどの活性酸素分解系を欠如することが主な要因であると述べられている。しかし筆者は代表的な絶対嫌気性菌で、バイオマスエネルギー生産や環境浄化分野の主力菌であるクロストリジウム属細菌のO<sub>2</sub>感受性機構の解明を目的として研究した結果、逆に優れたO<sub>2</sub>応答機構・O<sub>2</sub>代謝系・活性酸素分解系の存在を同定し、世界に先駆けて報告した。

### 2. 研究の目的

上記の背景を基に、本研究では絶対嫌気性菌において同定された未知のO<sub>2</sub>応答機構・O<sub>2</sub>代謝系・活性酸素分解系の詳細な酵素反応機構の解明を目的として、代表的な絶対嫌気性菌である*Clostridium*属細菌と*Bifidobacterium*属細菌を供試菌として用い研究を行った。また本実験にはさらなるO<sub>2</sub>耐性を有する嫌気性細菌の取得が必要になったことから、自然界のサンプルからO<sub>2</sub>耐性嫌気性細菌の単離に着手した。

### 3. 研究の方法

クロストリジウム属細菌で発見されたO<sub>2</sub>応答性タンパク質の機能を解明するために、タンパク質の精製と酵素反応解析、および構造解析に着手した。目的遺伝子をPCRで増幅後、pET系の発現ベクターに組み込み、大腸菌における大量発現とタンパク質の精製を行った。全ての精製酵素を用いて、O<sub>2</sub>代謝と活性酸素代謝に関する詳細な酵素反応解析を行った。また本タンパク質群の結晶解析を兵庫県立大

学大学院の樋口芳樹教授との共同研究で進め、兵庫県播磨のスプリング8にてX線結晶解析を行った。ピフィズス菌の酸素感受性機構の解明に関しては、ピフィズス菌属の代表種でO<sub>2</sub>感受性を示す*B. bifidum*からO<sub>2</sub>感受性の原因酵素の精製を行った。各種カラムクロマトグラフィーを行い、純粋酵素の精製を行った。またさらなるO<sub>2</sub>耐性ピフィズス菌の探索を行った。これまでにミツバチの腸管から単離された種が優れたO<sub>2</sub>耐性能を有するとの報告があることから、花に着眼し、花に生息する嫌気性細菌の単離を行った。

### 4. 研究成果

クロストリジウムから5つの酵素精製に成功し、O<sub>2</sub>と活性酸素を同時に、かつ高速に還元消去する新規な複合酵素系の同定(AEM 2009に発表)、複合酵素系の中心的役割を担うNROR-Rd複合体の結晶構造解析(Acta Crystal. 2010, Proteins 2010に発表)、またピフィズス菌に関してはO<sub>2</sub>感受性株からH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成に關与する原因酵素の精製に成功し、ピリミジン合成の鍵酵素であるb-type Dihydroorotate dehydrogenaseと同定した(AEM2009に発表)。またO<sub>2</sub>に耐性を有するピフィズス菌の探索を行う過程で、花から新種の乳酸菌の単離に成功し、*Lactobacillus ozensis*と*Lactobacillus floricola*と命名した(IJSEM2010に計2報発表)。

### 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9件)

論文名：*Lactobacillus ozensis* sp. nov., a novel lactic acid bacteria isolated from mountain flower.

著者名：Kawasaki, S., K. Kurosawa, M. Miyazaki, M. Sakamoto, M. Ohkuma, Y. Niimura.

雑誌名：*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:2435-2438.(2011) 査読有

論文名：*Lactobacillus floricola* sp. nov.,

a novel lactic acid bacteria isolated from mountain flowers in Japan.

著者名：Kawasaki, S., K. Kurosawa, M. Miyazaki, C. Yagi, Y. Kitajima, S. Tanaka, T. Irisawa, S. Okada, M. Sakamoto, M. Ohkuma, Y. Niimura.

雑誌名：*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:1356-1359.(2011) 査読有

論文名:嫌気性菌と酸素(総説)

著者名:川崎信治

雑誌名：微生物生態学会誌、9月号、p18 (2010) 査読無

論文名：Crystal structure of NADH:rubredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*: a key component of the dioxygen scavenging system in obligatory anaerobes.

著者名：Nishikawa, K, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Niimura and Y. Higuchi.

雑誌名：*Proteins.* 78:1066-1070. (2010) 査読有

論文名: Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADH:rubredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*.

著者名：Nishikawa, K., Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Niimura and Y. Higuchi.

雑誌名：*Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66:23-25. (2010) 査読有

論文名：O<sub>2</sub> and reactive oxygen species detoxification complex, composed of O<sub>2</sub>-responsive NADH:rubredoxin oxidoreductase-flavoprotein A<sub>2</sub>-desulfoferrodoxin operon enzymes, rubperoxin, and rubredoxin, in *Clostridium acetobutylicum*.

著者名：Kawasaki, S., Y. Sakai, T. Takahashi, I. Suzuki, Y. Niimura.

雑誌名：*Applied and Environmental Microbiology*, 75:1021-1029. (2009) 査読有

論文名：*b*-type dihydroorotate dehydrogenase is purified as a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-forming NADH oxidase from *Bifidobacterium bifidum*.

著者名：Kawasaki, S., Y. Sakai, T.

Takahashi, I. Suzuki, Y. Niimura.

雑誌名：*Applied and Environmental Microbiology*, 75:629-636.(2009) 査読有

論文名：Sodium acetate enhances hydrogen peroxide production in *Weissella cibaria*.

著者名：Endo, A, K. Futagawa-Endo, S. Kawasaki, L.M. Dicks, Y. Niimura, S. Okada.

雑誌名：*Lett. Appl. Microbiol.* 49:136-141. (2009) 査読有

論文名：Expression pattern of a chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Chlorella vulgaris* during hardening and its interaction with 2-Cys peroxiredoxin.

著者名：Machida, T, E. Kato, A. Ishibashi, J. Sato, S. Kawasaki, Y. Niimura, K. Honjoh, T. Miyamoto.

雑誌名：*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:695-701.(2009) 査読有

〔学会発表〕(計20件)

演題：*Bifidobacterium*属細菌の酸素感受性の原因酵素に関する研究

発表者：林恭兵

学会名：平成23年度日本乳酸菌学会

日時、場所：2011年7月11日、関西大学

演題：花に生息する嫌気性細菌に関する研究

発表者：黒沢佳奈

学会名：平成22年度日本微生物生態学会

日時、場所：2010年11月25日、筑波大学

演題：Mechanism of growth inhibition by oxygen in *Bifidobacterium* species.

発表者：川崎信治

学会名：International conference on Gastro-Intestinal Microbial Ecology (2010)

日時、場所：2010年11月10日、スロバキア・コチシェ

演題：嫌気性細菌の酸素適応機構

講演者：川崎信治

学会名：微生物生態学会シンポジウム(2009)

場所：2009年11月23日、広島大学

演題：嫌気性菌の酸素適応機構

講演者：川崎信治

学会名：理研 BRC 国際シンポジウム(2009)  
日時、場所：2009年2月10日、ハイアット  
リージェンシ東京

〔図書〕(計2件)

題名:Response of *Bifidobacterium* species  
to oxygen.

著者名：Shinji Kawasaki

著書名：Lactic Acid Bacteria and  
Bifidobacteria (2011). 総ページ数286ペー  
ジ、Chapter 6 担当 (p103-110), Horizon  
Press, United Kingdom.

題名:ビフィズス菌の酸素ストレス

著者名:川崎信治

著書名：乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス  
(2010).総ページ数 686 ページ、第2章 7項  
-4 担当 (p219-223) 京都大学出版

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

川崎 信治 (Shinji Kawasaki)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50339090

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：