

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780060

研究課題名 (和文) 乳酸菌における酸素分子認識機構の解明

研究課題名 (英文) Evaluation of oxygen sensing mechanism(s) 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)：

本研究で我々は、乳酸菌の酸素応答に関与する制御因子の探索を行い、*Streptococcus mutans* における抗酸化因子の酸素による誘導に関与する制御因子として、RNAポリメラーゼ結合蛋白質であるSpxを同定した。*S. mutans*は2つのSpx (SpxA, SpxB) を持つが、両*spx*遺伝子を欠損した株は、抗酸化因子の発現量が顕著に低下し、好気条件下での生育能を欠失した。また、大腸菌での組換え蛋白質としてSpxA、SpxB蛋白質を取得し、両蛋白質の酸化型・還元型を区別する評価系を構築した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study we investigated the oxygen sensing mechanism(s) in lactic acid bacteria, and identified Spx homologues (SpxA and SpxB), which are known as RNA-binding protein of *Bacillus subtilis*, as regulators required for oxygen-dependent induction of antioxidants in *Streptococcus mutans*. The *spxA* and *spxB* defective mutant of *S. mutans* was shown to lose the abilities to induce the expression of antioxidants and to grow under aerobic conditions. We also purified recombinant SpxA and SpxB proteins and constructed an assay system to distinguish oxidized- and reduced-form of the proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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。そこで、本研究では、乳酸菌において酸素分子の認識に関与する制御因子の同定を行うものとした。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、乳酸菌の一種である口腔内連鎖球菌連鎖球菌 *Streptococcus mutans* の好氣的環境適応能力に着目し、研究を行ってきた。その結果、*S. mutans* には独自の酸素利用系・酸素耐性メカニズムが存在することを新たに発見した。同時に、これら研究の過程で、好気代謝や酸素耐性に関する因子の発現が酸素によって誘導されることを見出した。*S. mutans* では、Dpr, AhpC, Nox-1 (過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼ), Nox-2 (水生成型 NADH オキシダーゼ), スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、グルタチオンレダクターゼ (GR) が酸素によって誘導される。このうち、Dpr, AhpC, Nox-1 の誘導は、PerR ホモログによって抑制的に制御されている。他方、Nox-2 の誘導は PerR に寄らないことが明らかとなった。また、SOD は他のグラム陽性菌でも酸素あるいは活性酸素によって誘導されるが、グラム陰性菌の SOD の制御因子である SoxR がグラム陽性菌には存在しないため、その誘導メカニズムは不明である。

そこで本研究では、1) *S. mutans* における Nox-2 及び SOD の酸素による誘導に関わる制御因子を同定すること、2) 同定した制御因子の精製蛋白質を取得し、その制御機構の解析を行うこと、3) 他の乳酸菌における制御因子ホモログの機能を解析すること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) *S. mutans* における制御因子の同定

*S. mutans* における制御因子の同定には、pGhost9:ISS1 を用いたランダム挿入変異システムを用いたスクリーニングと、ゲノム情報に基づいた潜在的な制御因子の探索の2つの方法を用い、欠損させることで抗酸化因子の発現に影響を与える遺伝子を選抜した。

### 2) 組換え蛋白質の取得とレドックスセンサーとしての評価

1) で同定された制御因子を、大腸菌での組換え蛋白質として発現させ、精製票品を取得し、レドックスセンサーとしての評価を試みた。

### 3) *Lactobacillus reuteri* における制御因子欠損株の作成と特性の評価

1) で同定された遺伝子のホモログの *L. reuteri* の欠損株を作製することで、その機能の解析を試みた。

## 4. 研究成果

### 1) 制御因子の同定

*S. mutans* における抗酸化因子の発現に関与する制御因子の探索を行った結果、枯草菌で RNA ポリメラーゼ結合蛋白質として報告されている Spx ホモログの同定に成功した。*S. mutans* のゲノム上には2つの Spx ホモログ (SpxA 及び SpxB) が存在するが、欠損株を作製した結果、*spxA* の欠損は好気条件下で顕著な生育遅延を引き起こし、*spxA*, *spxB* の2重欠損株は完全に好気条件下での生育能を欠失することが明らかとなった。各欠損株における抗酸化因子の発現様式を解析した結果、野生株では菌体を酸素に曝すことで、全ての抗酸化因子の発現が誘導されたが、*spxA* 欠損株では、酸素による各抗酸化因子の誘導量が大きく低下し、Nox-2 に関してはその発現が認められなくなった。*spxB* 欠損株の各抗酸化蛋白質の発現様式は野生株と同様であったが、*spxA*, *spxB* 重欠損株では、*spxA* 欠損株でわずかに認められた AhpC, Nox-1, Dpr, SOD の発現が、ほとんど見られなくなった。これらの結果から、Spx 蛋白質が酸素による抗酸化蛋白質の誘導を制御している重要な因子であることが示された。両 Spx 蛋白質のうち、SpxA の欠損が生育と抗酸化因子の発現に顕著に影響を与えるため、SpxA が主要な役割を担っていると考えられる。一方、SpxB も単独の欠損では影響は認められないものの、SpxA の非存在下では欠損の影響が認められるため、補助的な働きを持つと考えられた。

以上の結果から、*S. mutans* においては、両 Spx 蛋白質が抗酸化因子の酸素による誘導に必要で有り、好氣的環境への適応において重要な役割を担っていることが明らかとなった。Spx ホモログは、*S. mutans* だけでなく、他の乳酸菌のゲノム上にもひとつ以上のホモ

ログが確認される。*S. mutans* 以外の乳酸菌でも、抗酸化因子や好気代謝の酵素、細胞への付着性などが酸素によって制御されることが知られているので、今後 Spx ホモログの機能を解析することで、乳酸菌における役割が明らかになると期待される。

#### 2) 制御因子組換え蛋白質の取得とレドックスセンサーとしての評価法の確立

制御因子として同定された SpxA 及び SpxB を pET28b を用い、大腸菌の組換え蛋白質として、発現させた。SpxB は通常の条件下で発現したが、SpxA は培地中に鉄あるいは亜鉛イオンを添加した際のみ発現が認められた。両 Spx 蛋白質はいずれも不溶性蛋白質として発現したので、一旦尿素を用い可溶化し、ニッケルカラムに結合させてから、カラム上で徐々に尿素の濃度を下げることで、高次構造の巻き戻しを行い、可溶性の蛋白質を得た。枯草菌の Spx 蛋白質では、分子内のシステイン残基の酸化・還元がセンサーとして機能すると考えられている。そこで、*S. mutans* の両 Spx 蛋白質の還元型のチオール基を 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid でラベルすることで、酸化・還元型を評価する系を構築した。この評価系を用い、10 mM の過酸化水素で SpxA および SpxB を処理したところ、過酸化水素によって両 Spx 蛋白質が酸化されることが明らかとなった。ただし、本実験で使用した過酸化水素の濃度は生理的な条件より高く、今後構築した評価系を用いて、過酸化水素以外に Spx 分子を酸化する生理的な分子の探索を行う必要がある。Spx は *B. subtilis* で発見され、*B. subtilis* ではその制御機構の詳細が研究されているが、未だにどのような分子が Spx の酸化に直接関与しているのかは不明であり、シグナル分子の同定は *S. mutans* の Spx のみならず、グラム陽性細菌に広く保存されている Spx 分子の機能の解明に寄与すると期待される。

#### 3) *L. reuteri* における制御因子欠損株の作製

*L. reuteri* は様々な動物の腸管で見られる乳酸菌であり、腸管環境への高い適応能力を持つと考えられる。本研究では、研究成果 1) で同定された Spx について、*L. reuteri* の *spx* 欠損株を作製し、その生理的役割、特に腸管内環境への適応機構における役割について検討試みるものとした。しかしながら、ノックアウトベクターの作製には成功したものの、*L. reuteri* の *spx* 欠損株を得ることができず、本菌における *spx* の役割を解析することができなかつた。*L. reuteri* においては *spx* 遺伝子が必須である可能性もあるので、今後欠損株を作製する条件などを検討する必要があると考えられる。

#### 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 4 件)

- ① 山本裕司、乳酸菌の酸素感知・応答機構、日本乳酸菌学会誌、査読無、21 巻、2010、3-9.
- ② Cesselin B, Derre-Bobillot, Ferencik A, Lamberet G, Lechardeur D, Yamamoto Y, Petersen MB, Garrigues C, Gaudu P, Respiration, a strategy to avoid oxidative stress in *Lactococcus lactis*, is regulated by the heme status, 日本乳酸菌学会誌、査読無、21 巻、2010、10-15.
- ③ Ishikawa S, Suzuki K, Fukuda E, Arihara K, Yamamoto Y, Mukai T, Itoh M, Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. FEBS Lett, 査読有、584 巻、2010、770-4.
- ④ 山本裕司、細胞にとっての必要悪？-シグナル分子としての過酸化水素の役割-、日本生物工学会誌、査読無、87 巻、2010、191.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山本裕司ら、*Streptococcus mutans* の酸素感知機構における Spx と PerR の役割、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京.
- ② 山本裕司、乳酸菌の酸素感知・応答機構、日本乳酸菌学会 2009 年度秋期セミナー、2009 年 11 月 27 日、東京.
- ③ 青木麻智子ら、口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* における酸素分圧応答機構の解析、第 62 回日本細菌学会東北支部総会、2008 年 8 月 22 日、十和田.
- ④ 山本裕司ら、口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* におけるレドックスセンサーの同定、日本乳酸菌学会 2008 年度大会、2008 年 7 月 15 日、東京.

#### 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：10453507