

## 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8日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580101

研究課題名（和文） 腸内の過酸化物を迅速に分解するプロバイオティクス乳酸菌の開発

研究課題名（英文）

Development of Pro-biotic Lactic Acid Bacteria Scavenging Environmental Hydroperoxides

研究代表者

新村 洋一（NIIMURA YOUICHI）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00180563

## 研究成果の概要（和文）：

過酸化脂質分解力の強い菌株である *Lactobacillus plantarum* P2 株より、2 個の過酸化脂質分解酵素を精製し、その遺伝子のクローニングと発現系の構築に成功した。この酵素を大量精製後、それを用いて酵素解析を行った。

本酵素は過酸化脂質から迅速に対応するアルコールを生成するため、安全性は証明できた。この反応解析の過程で、本酵素が電子供与体として NAD(P)H のみを要求し、補助タンパクと他の補欠分子属が不要のため、従来にない新酵素であることが示唆された。そこで、具体的目標として、タンパク結晶を作製し立体構造解析が必須となった。

## 研究成果の概要（英文）：

In order to get lactic acid bacteria scavenging environmental lipid peroxide, we successfully isolated *Lactobacillus plantarum* P2 strain and purified two lipid peroxide reductases from the bacteria. The enzymes catalyze the reduction of lipid peroxide to its alcohol derivative with NAD(P)H as the preferred electron donor. The gene of the enzyme was cloned and overexpressed in *E.coli*. The recombinant enzyme has been purified to homogeneity and analyzed to get enzymatic parameters.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：乳酸菌、プロバイオティクス、過酸化脂質、過酸化脂質分解

## 1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクス分野で、多種の乳酸菌開発が報告されているが、菌体外の過酸化物を分解する菌株開発の報告は、一般微生物界においても見いだせなかった。過酸化脂質分解乳酸菌には酸化ストレスに対するプロバイオティクス効果が期待される。そこで本申請では、過酸化脂質分解乳酸菌の分離からスタートした。

## 2. 研究の目的

本申請の最終目標は、生きて腸内に到達し、腸内の過酸化脂質と過酸化水素を迅速に分解する乳酸菌株の機能開発である。過酸化脂質分解菌 (*Lactobacillus plantarum* P2 株) と過酸化水素分解菌 (*Pediococcus pentosaceus* Be1 株) を分離、分解関与の各

過酸化還元酵素系精製を試み、両株の全関与酵素完全精製に成功した。

Be1 株は、Mg-catalase, NADH peroxidase, NADH alkyl peroxide reductase, H<sub>2</sub>O forming-NADH oxidase を有し、P2 株は、NADH peroxidase, 2 種の NADH alkylperoxide reductase, H<sub>2</sub>O forming-NADH oxidase を有していた。各精製酵素の諸性質の検討から、過酸化水素分解力の強い Be1 株は、2 個の強力な過酸化水素分解酵素を持ち、過酸化脂質分解力の強い菌株である P2 株は、2 個の強力な過酸化脂質還元酵素(電子供与体 NAD(P)H)を持つことが示唆された。

生菌体による過酸化分解反応の安全性確認には、反応の要となる酵素の反応解析が最も有効である。また、過酸化物の中で、過酸化脂質は特に不安定なため、迅速に安定なアルコール体が還元生成するかが安全性確認の鍵となる。

そこで本年度では、(1)P2株由来の 2 過酸化脂質還元酵素遺伝子をクローニングし、その発現系を大腸菌で構築する。この大腸菌を大量培養し、発現酵素の大量精製を試みる。

(2)各精製酵素を用いた酵素反応解析(反応生成物の同定と、Km, Vmax値の測定、反応機構解析)を行う。

### 3. 研究の方法

(1) P2 株由来の GR2 または GR4 を大量発現する大腸菌を構築することに成功した。GR2 および GR4 発現大腸菌は、培養する LB 培地に bacto tryptone (difco 社)の代替品としてしばしば用いられる polypeptone (日本製薬)を使用すると、IPTG 添加しても GR2 および GR4 の発現が一切行われないことを確認している。この点を留意して構築した発現大腸菌からの GR2 および GR4 の精製を行う。

P2 株より見つかった過酸化アルキル還元酵素 GR2 及び GR4 は、酵素精製による酵素の獲得量が極めて少ないため、酵素量を必要とする諸性質解析やウエスタンブロッティング用抗体の作製、結晶構造解析など様々な解析を難しくしていた。そのため先ず P2 株由来の GR2 または GR4 を大量発現する大腸菌を構築し、これを用いて大量培養し、酵素精製を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 分子量約 48 kDa 付近に単一のタンパクを得ることに成功した。

膜遠心濃縮ではタンパク質凝集が起こることを確認しているため(GR2)、限外ろ過により濃縮透析を行うことにした。膜は

ADVANTEC ULTRA FILTER P0500 (50kDa cut) を使用し、3.9kPa 以下の圧力により溶出させた。200mL の精製 GR4 液は Abs450 = 0.067 であった。これを 13.3 倍濃縮して 15mL にした。精製 GR2 は 2.77mg/mL が 11mL あり、計 30.5mg であった。

(2)各精製酵素を用いた酵素反応解析  
精製した GR2, GR4 の N 末端アミノ酸配列を解析し、一致を見いだしたので、酵素反応解析を以下に行った。

今回読んだ精製 GR2 の N 末端アミノ酸配列

Met-Ser-Glu-Lys-Phe-Asp-Val-Val-Tyr-Leu-Gly-

P1-2 株由来 GR2 の N 末端アミノ酸配列

Ser-Glu-Lys-Phe-Asp-Val-Val-Tyr-Leu-Gly-

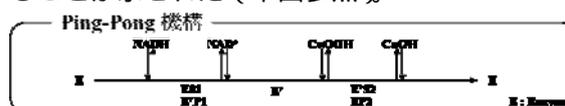
今回読んだ精製 GR4 の N 末端アミノ酸配列

Met-Thr-Asn-Lys-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Val-Leu-Tyr-

P1-2 株由来 GR4 の N 末端アミノ酸配列

Thr-Asn-Lys-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Val-Leu-Tyr-

GR2, GR4 はそれぞれ分子量 44.7kDa, 48.6kDa の homo dimer であり、FAD を有するフラビン酵素で、活性中心として SH 基を 2 つ持ち、触媒反応は Ping-Pong 機構であることが示された(下図参照)。



これは GR2, GR4 と homology の高い glutathione reductase や dihydrolipoamide dehydrogenase と非常に近い性質である。しかし基質特異性実験の結果、GR2, GR4 は glutathione reductase 及び dihydrolipoamide dehydrogenase の共通基質 (DCIP, ferricyanide) に活性を示し、各種合成過酸化アルキル及び過酸化リノール酸に対し活性を示したが、glutathione および dihydrolipoamide には活性を示さなかった(表 1, 表 2)。

表 1. GR2 の基質特異性

Substrate	電子供与体 :NADH	電子供与体 NADPH
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.18 ± 0.00	0.26 ± 0.00
t-butyl hydroperoxide	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.00
Cumene hydroperoxide	5.53 ± 0.08	5.90 ± 0.29
1,1,3,3-tetramethylbutyl hydroperoxide	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.00
p-menthane hydroperoxide	1.25 ± 0.02	1.50 ± 0.14
Diisopropylbenzene hydroperoxide	1.07 ± 0.01	1.36 ± 0.13
過酸化リノール酸	1.38 ± 0.01	1.31 ± 0.03
DCIP	2.33 ± 0.12	0.98 ± 0.08
Ferricyanide	2.65 ± 0.11	0.19 ± 0.00
FAD	N.D.	N.D.
FMN	N.D.	N.D.
Cytochrome C	N.D.	N.D.
Menadione	0.41 ± 0.01	N.D.
酸化型グルタチオン	N.D.	N.D.
Lipoamide	N.D.	N.D.
Dihydrolipoamide	N.D.	N.D.

N.D. = Not detection 活性値単位は(μmol / min / mg)

一方 glutathione reductase 及び dihydrolipoamide dehydrogenase (*E. coli* cell free) は各々の特異基質に活性を示したが、双方とも過酸化物質に対し活性を示さなかった。

表 2 . GR2 の基質特異性

Substrate	電子供与体 : NADH	電子供与体 : NADPH
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.99 ± 0.02	1.07 ± 0.03
t-butyl hydroperoxide	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.00
Cumene hydroperoxide	3.10 ± 0.04	3.32 ± 0.27
1,1,3,3-tetramethyl butyl hydroperoxide	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.02
p-menthane hydroperoxide	0.18 ± 0.00	0.25 ± 0.04
Diisopropylbenzene hydroperoxide	1.88 ± 0.04	1.77 ± 0.09
過酸化リノール酸	1.09 ± 0.01	1.09 ± 0.03
DCIP	1.18 ± 0.05	0.61 ± 0.01
Ferricyanide	2.44 ± 0.10	2.61 ± 0.33
FAD	N.D.	N.D.
FMN	N.D.	N.D.
Cytochrome C	N.D.	N.D.
Menadione	0.65 ± 0.03	N.D.
酸化型グルタチオン	N.D.	N.D.
Lipoamide	N.D.	N.D.
Dihydrolipoamide	N.D.	N.D.

N.D. = Not detection 活性値単位は(μmol / min / mg)

このことから、GR2、GR4 はこれら homology の高い酵素とは異なり、過酸化物質還元酵素として機能する可能性が示唆された。

次に酵素速度論的解析を試みた(図 1, 図 2 )

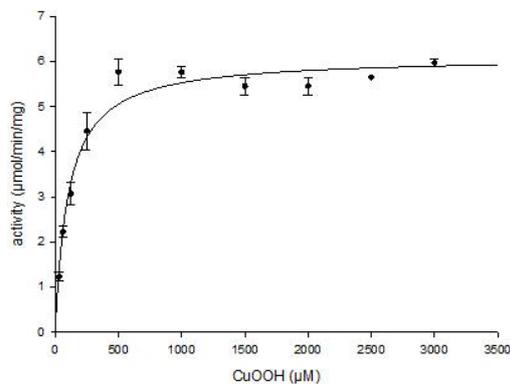


図 1 . Cumene hydroperoxide に対する GR2 の反応速度(NADH 150 μM、25 ) Km = 103.5 μM, Vmax = 6.15 μmol / min / mg.protein

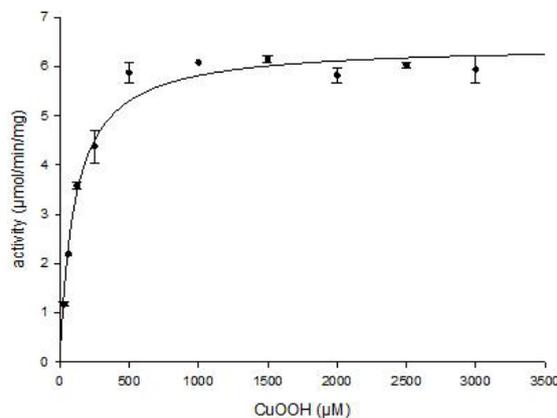


図 2 . Cumene hydroperoxide に対する GR2 の反応速度(NADPH 150 μM、25 ) Km = 107.6 μM, Vmax = 6.4 μmol / min / mg.protein

表 3 . Cumene hydroperoxide に対する反応性

Enzyme	Km (μM)	Vmax (μmol/min/mg)	Vmax / Km	kcat / Km (s <sup>-1</sup> )
<b>GR2</b>	<b>112.6 ± 10.7</b>	<b>11.0 ± 0.2</b>	<b>9.8 × 10<sup>2</sup></b>	<b>7.3 × 10<sup>4</sup></b>
<b>GR4</b>	<b>3420 ± 390</b>	<b>18.1 ± 1.3</b>	<b>5.0 × 10<sup>3</sup></b>	<b>4.3 × 10<sup>3</sup></b>
<i>Homo Sapiens</i> GST A1-1	66	13.4	2.0 × 10 <sup>2</sup>	2.2 × 10 <sup>5</sup>
<i>Homo Sapiens</i> GPx	120	1.1	9.0 × 10 <sup>2</sup>	1.5 × 10 <sup>4</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Grx1	520			2.0 × 10 <sup>4</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Grx2	870			1.5 × 10 <sup>4</sup>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> GPx	63			1.4 × 10 <sup>4</sup>
<i>Brevia repta</i> Grx	11.7	14.7	1.3	

表 4 . 過酸化リノール酸に対する反応性

Enzyme	Km (μM)	Vmax (μmol/min/mg)	Vmax / Km	kcat / Km (s <sup>-1</sup> )
<b>GR2</b>	<b>1750 ± 350</b>	<b>9.5 ± 1.0</b>	<b>5.0 × 10<sup>3</sup></b>	<b>4.1 × 10<sup>3</sup></b>
<b>GR4</b>	<b>307.2 ± 24.5</b>	<b>2.8 ± 0.0</b>	<b>9.0 × 10<sup>3</sup></b>	<b>4.9 × 10<sup>3</sup></b>
<i>Helicobacter cerasi</i> GPx	82.7	42.4	5.0 × 10 <sup>4</sup>	
<i>Lycopodium obscurum</i> GPx	39.3	27	6.9 × 10 <sup>4</sup>	
<i>Trypanosoma brucei</i> GPx				4.0 × 10 <sup>4</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i> PCC7720 GPx				6.4 × 10 <sup>5</sup>

酵素速度論的解析において、cumenehydroperoxide に対する kcat/Km は疎水性過酸化物質還元酵素として広く知られる *H. sapiens* glutathione peroxidase が  $6.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、*S. cerevisiae* glutaredoxin が  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であるのに対し、GR2 は  $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  とほぼ中間ほどの値を示しており (GR4 は  $4.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )、既知酵素と比較しても決して劣らない還元能力を有することがわかった (表 3)。GR2、GR4 の過酸化リノール酸に対する kcat/Km は、既知の疎水性過酸化物質還元酵素と比較してやや低い値であった (表 4)。これに関しては今後、その他の天然基質も加えての解析が重要になると考えられる。

Homology の高い酵素とは異なり過酸化物質に特異的な活性を示す GR2、GR4 がなぜ過酸化物質という基質を選択することができるのか、今後立体構造の面からアプローチが必須である。

## 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 9 件)

*Lactobacillus ozensis* sp. nov., a novel lactic acid bacteria isolated from mountain flowers in Oze National Park. Kawasaki S, Kurosawa K, Miyazaki M, Sakamoto M, Ohkuma M, Y. Niimura, 査読あり *It. J. Syst. Evol. Microbiol* **61** 巻, p. 2435-2438 (2011)

*Lactobacillus floricola* sp. nov., a novel lactic acid bacteria isolated from mountain flowers in Japan. Kawasaki S, Kurosawa K, Miyazaki M, Yagi C, Kitajima Y, Tanaka S, Irisawa T, Okada S, Sakamoto M, Ohkuma M, Y. Niimura, 査読あり *It. J. Syst. Evol. Microbiol* **61** 巻, p. 1356-1359 (2011)

*Synechocystis* ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction in the absence or presence of free flavin Junichi S., K. Takeda, R. Nishiyama, T. Watanabe, M. Abo, E. Yoshimura, J. Nakagawa, A. Abe, S. Kawasaki, Y. Niimura, 査読あり *Biometals*, **24** 巻, p. 311-321 (2011)

*Escherichia coli* ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase are capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction, K. Takeda, J. Sato, K. Goto, T. Fujita, T. Watanabe, M. Abo, E. Yoshimura, J. Nakagawa, A. Abe, S. Kawasaki, Y. Niimura, 査読あり *Biometals*, **23** 巻, p. 727-737 (2010)

*Chlorella vulgaris* aldehyde reductase is capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction in the presence of free flavin, J. Sato, K. Takeda, R. Nishiyama, K. Fusayama, T. Arai, T. Sato, T. Watanabe, A. Abe, J. Nakagawa, S. Kawasaki, Y. Niimura, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74** 巻, p. 854-857, (2010) 査読あり

Crystal structure of NADH:rubredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*: a key component of the dioxygen scavenging system in obligatory anaerobes. Nishikawa K., Shomura Y., Kawasaki S., Y. Niimura, H. Yoshiki. 査読あり *Proteins*, **78** 巻 1066, (2010)

Sodium Acetate Enhances Hydrogen Peroxide Production in *Weissella cibaria*.

A. Endo, Y. Futagawa-Endo, S. Kawasaki, Leon M.T. Dicks, Y. Niimura & S. Okada, 査読あり *Letters in Applied Microbiology-LAN*, LAN-2009-0126.R2 (2009)

Structure analysis of the flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F reveals key residues that discriminate the functions and properties of the flavin reductase family. N. Shibata, Y. Ueda, D. Takeuchi, Y. Haruyama, S. Kojima, J. Sato, Y. Niimura, M. Kitamura, Y. Higuchi 査読あり

*FEBS Journal*, **276** 巻, 4840-4853 (2009)

O<sub>2</sub> and reactive oxygen species detoxification complex, composed of O<sub>2</sub>-responsive NADH:rubredoxin oxidoreductase-flavoprotein A2-desulfoferredoxin operon enzymes, rubperoxidase, and rubredoxin, in *Clostridium acetobutylicum*. Kawasaki, S, Y. Sakai, T. Takahashi, I. Suzuki and Y. Niimura 査読あり *Appl. Environ. Microbiol.* **75** 巻 1021-1029 (2009)

[学会発表](計 2 件)

微生物の過酸化分解酵素の多様性. 新村洋一、望月大地、新井俊晃、大山修平、佐藤純一、川崎信治、渡邊昭夫. 生体触媒化学シンポジウム平成23年 12月 21日、慶應義塾大学 薬学部

過酸化分解する乳酸菌の開発. 渡邊昭夫、大山修平、佐藤純一、新村洋一. 生体触媒化学シンポジウム 平成23年 12月 21日、慶應義塾大学 薬学部

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新村 洋一 ( NIIMURA YOUICHI )  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：00180563

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：