

乳酸菌 *Lactobacillus casei* シロタ株における
酸化ストレス耐性機構に関する研究

2018年1月

世良田 雅紀

乳酸菌 *Lactobacillus casei* シロタ株における
酸化ストレス耐性機構に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士 (農学) 学位論文

世良田 雅紀

目次

第1章 序論.....	1
第2章 <i>Lactobacillus casei</i> シロタ株のスーパーオキシド耐性におけるスーパーオキシド ジスムターゼとマンガンの影響、およびマンガン輸送システムの解析.....	4
2.1 緒言.....	4
2.2 材料と方法.....	5
2.3 結果.....	9
2.4 考察.....	11
第3章 <i>Lactobacillus casei</i> シロタ株の酸化ストレス耐性におけるチオレドキシソと チオレドキシソレダクターゼの役割.....	22
3.1 緒言.....	22
3.2 材料と方法.....	23
3.3 結果.....	26
3.4 考察.....	29
第4章 <i>Lactobacillus casei</i> シロタ株の新規過酸化水素耐性遺伝子の機能解析.....	41
4.1 緒言.....	41
4.2 材料と方法.....	41
4.3 結果.....	45
4.4 考察.....	48
第5章 総括.....	68
参考文献.....	72
主論文目録.....	81
謝辞.....	82

第1章 序論

地球は、酸素を約 21% 含む大気に覆われている。そこに生息する好気性生物は、酸素を利用してエネルギーを獲得し、生命を維持している。しかし、酸素の一部は不安定であり、多くの物質と反応しやすい活性酸素種 (ROS) に変化する。ROS は酸化ストレスの主要因であり、細胞を損傷し、生育や代謝において様々な有害な影響を与え、哺乳類においては、老化や癌、その他様々な疾患を引き起こす要因となっている。ROS は、一般的にスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素の 4 種類とされている[1]。酸素から 1 電子還元でスーパーオキシド、2 電子還元で過酸化水素、3 電子還元でヒドロキシルラジカルが、酵素的、非酵素的に生成される。好気性生物は、自らの生命活動によって発生する ROS に絶えず晒されており、ROS は細胞内で DNA、タンパク質、脂質等に損傷を与えるが、好気性生物が生命を維持できるのは、それらの毒性を回避するシステムを備えているためである。代表的な活性酸素消去系の酵素として、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等が普遍的に存在している。

一方、通性嫌気性である乳酸菌は、一般的な生育環境下においては呼吸鎖が機能していないため、酸素は生育に不要であるが、好気的な条件下でも生育することが可能である。このため、乳酸菌においても酸素や活性酸素種の毒性を消去または回避する機構を持つことが知られている。酸素の消去系としては、NADH を用いて 2 電子還元により過酸化水素へ、また 4 電子還元により水へと変換する NADH オキシダーゼ[2-5]が知られている。スーパーオキシドの消去系としては、*Lactococcus* 属や *Streptococcus* 属のマンガン型スーパーオキシドジスムターゼがスーパーオキシドを過酸化水素および水へと不均化する反応を触媒している[6-8]。一方、SOD 活性を持たない *Lactobacillus casei* や *Lactobacillus plantarum* において、その代わりに細胞内に蓄積した millimolar レベルのマンガンがスーパーオキシドの消去に働くことも報告されている[9, 10]。乳酸菌はカタラーゼ陰性と定義されており、過酸化水素の消去には主として NADH ペルオキシダーゼ[4, 11]が関与している。乳酸菌がカタラーゼを持たないのは、補欠因子のヘムを合成することができないためであるが、*Enterococcus faecalis* では培地にヘムを添加するとカタラーゼの合成が可能である[12]。またそれ以外にも、*L. plantarum* においては、補欠因子としてマンガンを含む、マンガンカタラーゼ[13]を持

つ菌株も報告されている。また、*Streptococcus mutans* で報告された Dpr は、フェリチン様の鉄結合タンパク質であり、遊離の鉄イオンを分子内に取り込むことによって、過酸化水素と鉄イオンからヒドロキシルラジカルを発生させるフェントン反応を抑え、酸素耐性の獲得に寄与している[14]。このように、酸素や活性酸素を消去する様々な因子が報告されているが、ここで挙げた因子は乳酸菌に普遍的なものではなく、菌種や菌株に特異的であり、個々の菌株の消去機構は異なっている。そして、この消去機構の違いが、乳酸菌の菌株間で酸素や活性酸素耐性に差が生じている原因であると考えられている。

近年、乳酸菌のゲノム配列が公開されるにつれて、多くの乳酸菌のゲノム上に酸素、活性酸素種の毒性を消去または回避するこれらストレス耐性遺伝子の存在が示されている[15-18]。しかし、これらストレス耐性遺伝子の種類や数は菌種ごとに異なっている。*Lactobacillus casei* において、複数のゲノム配列が公開されており[19-23]、比較ゲノム解析も行われている[24]。これらの情報から、*L. casei* は NADH オキシダーゼ、NADH ペルオキシダーゼ、SOD 等の酸化ストレス耐性に関与する酵素をコードした遺伝子を共通に保有しているが、一方でマンガンカタラーゼや Dpr などは保有していなかった。このように、遺伝子情報は明らかになってきたが、これまでに *L. casei* において、これらタンパク質の生化学的な解析や、酸化ストレス耐性への関与についての生理的な解析に関する報告はほとんどなかった。

L. casei シロタ株は、古くから発酵乳の製造に使用されており、産業上において非常に有用な菌株である。また、*L. casei* シロタ株は最も広く研究されているプロバイオティクスの1つであり、多くの基礎研究や、臨床試験が実施されてきた。これまでに報告されている生理効果として、整腸効果[25, 26]、免疫調節作用[27]、抗アレルギー効果[28]、炎症性腸疾患改善作用[29]、発ガン抑制作用[30, 31]、感染防御作用[32, 33]、ストレス軽減作用[34]などが明らかにされている。またそのゲノム解析も行われゲノム配列が決定されている[35]。本菌株は、好気的な環境での発酵乳の製造が可能で、その後の流通や賞味期限日までの保存の過程で常に好気的な環境に置かれているにもかかわらず、製品中の高い生菌数の維持が可能である。このことから、本菌株はいくつもの酸化ストレス耐性の機構が機能していることが予想された。また、酸化ストレス耐性に関与するメカニズムの知見が得られれば、製品中での好気的な生残性を高める等の品質の改良や、高菌数の製品を提供することによる生理効果の向上等が期待できると考えた。

このような背景から、乳酸菌 *Lactobacillus casei* シロタ株の酸化ストレス耐性機構を解明することを目的に研究を行った。まず、第2章では、*L. casei* シロタ株のゲノム情報を調べた結果、スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子がゲノム上に存在することがわかった。従って、スーパーオキシドジスムターゼが機能しているか否かを評価し、さらにスーパーオキシド消去機構を明らかにすることを試みた。次に第3章では、活性酸素種の消去系ではなく、酸化還元状態の制御、タンパク質の修復に関与すると考えられる、チオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼの役割を調べた。そして、第4章では、既知の酸化ストレス耐性以外の因子を、酸化ストレス条件下でのマイクロアレイ解析により見出し、その機能を明らかにすることを試みた。

第2章 *Lactobacillus casei* シロタ株のスーパーオキシド耐性におけるスーパーオキシドジスムターゼとマンガンの影響、およびマンガン輸送システムの解析

2.1 緒言

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) はスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に不均化する酵素である[36]。一部の乳酸菌は SOD 活性を示すことが報告されているが[6-8]、*Lactobacillus casei* および *Lactobacillus plantarum* は SOD 活性を示さず、その代わりに細胞内に蓄積した millimolar レベルのマンガンがスーパーオキシドの消去に働くことが知られていた[9, 10]。しかし、最近では、*L. casei* はスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子をコードし、それらの発現を示唆する報告もある[37]。そこで、*L. casei* シロタ株のゲノムを調べたところ、ゲノム上にスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子 *sodA* が存在することが明らかとなった。

一方、マンガンの取り込みに関しては、*L. plantarum* において3つのシステムがあることが報告されている[38]。一つ目は、 Mn^{2+} - and Cd^{2+} - specific P-type ATPase (MntA)であり、マンガン枯渇細胞における、高いマンガン親和性を持つ取り込みシステムである[39]。二つ目は、ATP-binding cassette-type (ABC-type) transporter であり、溶質結合タンパク質、ATP 結合タンパク質、膜内在性タンパク質から構成されており、細菌において広く分布している。溶質結合タンパク質の変異株の解析により、酸素存在下、マンガン制限培地において、変異株の増殖性が阻害されることが報告されている[40-43]。三つ目は、自然抵抗性関連マクロファージタンパク質 (natural resistance-associated macrophage protein; NRAMP) トランスポーターである[44]。このタンパク質のホモログは細菌に広く分布しており、その特性が明らかにされている[45, 46]。*L. plantarum* を用いた研究で、これらの取り込み遺伝子の1つまたは2つを破壊しても、生育やマンガン取り込みに顕著な変化は認められず、マンガンの恒常性維持が高度に制御されていることが示唆されている[38]。一方、*L. casei* に関しては、これらマンガントランスポーターの機能について調べた報告は無い。

そこで本研究では、*L. casei* シロタ株のスーパーオキシド耐性に対する *sodA* およびマンガンの寄与を解析した。さらに、マンガントランスポーターの破壊株を用いたマンガンの取

り込み機構についても解析した。

2.2 材料と方法

2.2.1 菌株、プラスミド、培地、培養条件

本研究で使用した菌株とプラスミドは Table 2-1 に記載した。*Lactobacillus casei* シロタ株 (YIT 9029) は野生株として使用した。*Escherichia coli* JM109 (Toyobo) はプラスミド作製等のために形質転換する際のコンピテントセルとして使用した。*Escherichia coli* BLR (DE3) (Merck) はタンパク質発現の宿主として使用した。*Lactobacillus casei* ATCC334、*Lactococcus lactis* ATCC19435、および *Escherichia coli* K-12 HfrH は、*sodA* 遺伝子をクローニングするために使用した。プラスミド pYSSE3[47]は遺伝子欠失変異を導入するためのクローニングベクターとして使用した。プラスミド pYAP300[47]は、構成的な発現プロモーターを持ち、*L. casei* の染色体上の FSW フェージの *attB* サイトに遺伝子の組込みが可能なプラスミドであり、種々の *sodA* 遺伝子を *L. casei* シロタ株で発現させるために使用した。プラスミド pET-21(+)(Merck) は、組換えタンパク質の発現ベクターとして使用した。乳酸菌は、MRS 培地 (Becton Dickinson)、または、マンガンを除いた MRS 培地に種々の濃度のマンガンを添加したものをを用いて 37°C で静置好気培養した。大腸菌は LB 培地[48]を用いて 37°C で培養した。エリスロマイシン (Abbott) は、必要に応じて、終濃度が乳酸菌には 20 µg/ml、大腸菌には 500 µg/ml となるよう培地に添加した。培養液の濁度は Klett-Summerson photoelectric colorimeter (Klett MFG) または DU800 spectrophotometer (Beckman Coulter) を用いて測定した。

2.2.2 遺伝子欠失破壊株の作製

プラスミド pYSSE3 は、シャトルベクターである pBE31[49]から pAMβ1 由来の乳酸菌の複製領域を欠損させたものである。遺伝子欠失破壊株作製のための組換えプラスミドは、次に記載する方法で構築した。鋳型とした *L. casei* シロタ株のゲノム DNA、Table 2-2 に示すプライマー、および KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて、標的とする遺伝子の内部を欠失するような、5'末端と 3'末端をそれぞれ含む 2 つの断片を、PCR で増幅した。増幅

断片を Table 2-2 に示す適当な制限酵素で両端を切断した。増幅断片に対応する制限酵素であらかじめ切断し、Alkaline Phosphatase (Calf intestine, Takara Bio) を用いて脱リン酸化した pYSSE3 と、2 つの増幅断片を染色体上と同じ向きに、フレームをあわせて、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara Bio) を用いてライゲーションし組換えプラスミドを作製した。組換えプラスミドは Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いて精製し、エレクトロポレーション法[47]を用いて *L. casei* シロタ株に導入した。エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入法を、以下に記載する。20 ml の MRS 培地で対数増殖初期 (約 2 時間) まで菌を培養し、遠心分離して菌体を回収した。菌体は等量の 1 mM HEPES バッファー (pH 7.0) で 1 回洗浄し、続いて 2 分の 1 容量の 10% (w/v) のグリセロール、1 ml の 10% (w/v) のグリセロールで洗浄した。その後、菌体は培養液の 200 分の 1 容量の 10% (w/v) のグリセロールで懸濁した。エレクトロポレーションは 40 μ l のコンピテントセルと 1-2 μ l のプラスミド DNA の混合溶液を 2 mm 幅のキュベット (MBP) に移し、Gene Pulser II Electroporation system (Bio-Rad) を用いて、キャパシタンス 25 μ F、抵抗値 200 Ω 、電圧 1.5 kV の条件にて行った。菌体を 1 ml の MRS 培地に懸濁した後、37°C で 60 分間インキュベートした。この培養液を 20 μ g/ml のエリスロマイシンを添加した MRS 平板培地に塗布し、37°C にて 2-3 日間培養した。得られたコロニーについて、プラスミドがいずれかの断片の領域で相同組換えにより染色体上に組み込まれていることを PCR で確認した。このクローンを MRS 培地で 5 代以上継代培養した後エリスロマイシン無添加の MRS 培地に塗布し、培養した。生育したコロニーをエリスロマイシン添加、無添加の MRS 培地にレプリカし、エリスロマイシン感受性のクローンを選択した。

2.2.3 無細胞抽出液の調製

一晚培養した乳酸菌および大腸菌の 2 ml の培養液から遠心分離によって菌体を回収した。菌体は 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) を用いて 2 回洗浄した。菌体は 500 μ l の同バッファーに懸濁し、0.3 g のガラスビーズ (直径 0.1 mm) を加え、FastPrep FP120 cell disrupter (Thermo) を用いて、スピード 6.5 に設定し、30 秒間破碎した。破碎液は 18,000 \times g で 10 分間遠心分離した後、上清を無細胞抽出液として使用した。タンパク質の濃度は Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad) を用いて決定した。

2.2.4 SOD 活性 (スーパーオキシド消去活性) の測定

SOD 活性は、McCord の方法[36]に少し修正を加えて測定した。1.1 ml の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.8)、0.6 ml の 0.5 mM EDTA (上記バッファーを用いて調製)、0.5 ml の 0.06 mM シトクロム C 溶液 (上記バッファーを用いて調製)、0.5 ml の 0.3 mM キサンチン溶液 (上記バッファーを用いて調製)、および 0.1 ml のサンプル溶液を調製し混合した。反応は、0.2 ml のキサンチンオキシダーゼ溶液 [キサンチンオキシダーゼ (Sigma-Aldrich) を上記バッファーで希釈し、対照における 550 nm の吸光度の変化が 0.025/min となるように調製] を加えることで開始した。25°C で反応し、1 分間の 550 nm の吸光度の上昇値を求めた。対照における吸光度の上昇を 50%抑制するのに必要な酵素量を、1 U と定義した。マンガンのスーパーオキシド消去活性を含めて評価する場合は、EDTA を除いた反応液を用いて活性を測定した。

2.2.5 *sodA* のクローニングと組換え SOD タンパク質の発現

・ *L. casei* における発現

L. casei シロタ株、*L. lactis* ATCC19435 のそれぞれの *sodA* 遺伝子の SD 配列から終止コドンまでを増幅するように設計したプライマー (Table 2-2)、鋳型としたそれぞれの株のゲノム DNA、および KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて PCR を行った。増幅した PCR 産物およびプラスミド pYAP300 を *Sma* I、*Xba* I の制限酵素で切断後ライゲーションを行い、PCR 産物を pYAP300 に挿入した。次に、得られたプラスミド pYAP300-*sodA* または pYAP300-*LlsodA* を、2.2.2 遺伝子欠失破壊株の作製に記載した方法と同様に *L. casei* シロタ株に導入した。

・ 大腸菌における発現

L. casei シロタ株、*E. coli* K-12 HfrH 株の *sodA* 遺伝子をプライマー (Table 2-2)、鋳型としたそれぞれの株のゲノム DNA、および KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて PCR で増幅した。フォワードプライマーは、pET-21a(+)の SD 配列を含めて設計した。増幅した PCR 産物、およびプラスミド pET21(+)を *Bam*H I、*Xho* I の制限酵素で切断後ライゲーションを行い、PCR 産物を pET21(+)に挿入した。得られたプラスミド pET-21(+)-*sodAM* または pET-

21(+)-*EcsodA* を pET system manual (Merck) に従って、*E. coli* BLR(DE3)に導入した。

大腸菌での組換え SOD タンパク質の発現は、pET system manual (Merck) に少し修正を加えて行った。*E. coli* BSM4 (pET-21(+)-*sodAM* 導入株)、および *E. coli* BES3 (pET-21(+)-*EcsodA* 導入株)を 100 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地で OD₆₀₀ = 0.6 となるまで 30°C で培養した。IPTG を 1 mM となるように添加し、更に一晩 20°C または 30°C で培養した。無細胞抽出液および菌体について、常報に従って SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で解析した。ポリアクリルアミドゲルは Perfect NT Gel 5-20% (DRC) を使用した。トリクロロ酢酸を用いて濃縮した 50 µl の無細胞抽出液、または 30 µl の培養液から回収した菌体をサンプルバッファーと混合し、100°C で 5 分間処理したサンプルをアプライした。泳動後のゲルは CBB R250 溶液を用いて染色した。

2.2.6 パラコート処理

マンガン無添加 MRS 培地で菌株を一晩培養した前培養液を、マンガン無添加 MRS 培地、またはマンガン無添加 MRS 培地に終濃度 1 µg/ml となるようマンガンを添加した培地に 1% (v/v) 接種した。それぞれの培地にパラコートを 0、0.5、1、または 2 mM 添加して、37°C で培養し、Klett-Summerson photoelectric colorimeter (Klett MFG) を用いて、経時的に濁度を測定した。

2.2.7 菌体内マンガン濃度の測定

マンガン濃度を 0、0.1、0.2、0.5、1、3、10、30 µg/ml に調整した MRS 培地 30 ml に、マンガン無添加培地で培養した前培養液を 1% (v/v) 接種し 37°C で 24 時間培養した。培養後の菌液を 5,000 × g で 10 分間遠心分離して菌体を回収した。菌体を滅菌水で 2 回洗浄し、培養液と等量 (30 ml) の滅菌水に懸濁した。この菌体懸濁液サンプルのマンガン濃度を、ICP 発光分光分析装置 (Vista-Pro; Agilent) を用いて測定し、洗浄菌体の体積あたりのモル濃度として、菌体内マンガン濃度を算出した。

2.2.8 マルチプルアライメント

マルチプルアライメントは CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を使用

した。

2.3 結果

2.3.1 *L. casei* シロタ株の SOD の相同性

L. casei シロタ株はゲノム上に *sodA* 遺伝子をコードしていた。*L. casei* シロタ株の SOD の推定アミノ酸配列は他の細菌のマンガン型、鉄型、鉄/マンガン型の SOD と高い相同性を示した (Fig. 2-1)。活性部位とメタルリガンドのアミノ酸残基[7, 50]は、完全に保存されていた (Fig. 2-1)。Mn-SOD との相同性は、Fe-SOD との相同性よりも僅かに高かった (*B. subtilis* Mn-SOD、56% ; *L. lactis* Mn-SOD、53% ; *E. coli* Mn-SOD、50% ; *E. coli* Fe-SOD、41% ; *P. aeruginosa* Fe-SOD、41%)。それに加えて、*L. casei* シロタ株の SOD は Mn-SOD を特徴付けるアミノ酸残基を持っていたため[50]、Mn-SOD であると推測された。さらに、*L. casei* シロタ株の SOD は、鉄とマンガンのいずれも補欠因子として利用できる cambialistic SOD として最近報告された *B. anthracis* Fe/Mn SOD [51]とも高い相同性を示した。

2.3.2 野生株と組換え体の SOD 活性

Table 2-3 に野生株と組換え体の SOD 活性を示す。*L. lactis* の SOD 活性は 45.1 U/mg であったが、*L. casei* シロタ株および *L. casei* ATCC334 は、活性を検出できなかった。*L. casei* シロタ株において、*L. lactis* の *sodA* 遺伝子および *L. casei* シロタ株の *sodA* 遺伝子を導入し発現させたところ、*L. lactis* の *sodA* は *L. casei* シロタ株の中で SOD 活性を示した (MS1001)。一方、*L. casei* シロタ株の *sodA* は構成的に発現するプロモーターの下流に連結しても活性は検出されなかった (MS1002)。

さらに SOD タンパク質の発現について、大腸菌の pET システムを用いて検討した。IPTG の誘導の有無に関わらず、宿主である大腸菌 BLR(DE3)由来の SOD 活性を検出した。よって、IPTG を添加した誘導時の SOD 活性の上昇をもって組換えタンパク質の活性と判断することとした。1 mM IPTG 存在下、20°C で、一晩、組換えタンパク質の発現を誘導したところ、*L. casei* シロタ株の SOD は可溶性であった (Fig. 2-2)。しかし、*E. coli* BSM4 (*L. casei* シロタ株 SOD の発現株) の無細胞抽出液中の SOD 活性は、IPTG による誘導の有無に関わ

らず変化しなかった (Table 2-3)。対照的に、*E. coli* BES3 (*E. coli* SOD の過剰発現株) の無細胞抽出液中の SOD 活性は、IPTG による誘導により増加した (Table 2-3)。これらの結果から、*L. casei* シロタ株の SOD タンパク質は、たとえ可溶性の産物が生成されたとしても不活性型であることが示唆された。

2.3.3 SOD 活性および酸化ストレス耐性における、SOD とマンガンの影響

酸化ストレス耐性に関して SOD とマンガンの効果を評価した。*L. casei* シロタ株の野生株と MS1001 (*L. lactis soda* 発現株) の増殖性に及ぼすスーパーオキシドの発生剤であるパラコートを追加した時の影響を、マンガン無添加 MRS 培地または 1 µg/ml マンガン添加 MRS 培地を用いて調べた。両菌株の生育は、マンガン無添加培地において、部分的に阻害された (Fig. 2-3)。また、マンガン無添加培地においては、野生株の生育はパラコート濃度依存的に阻害されたが、*L. lactis soda* 発現株は、生育阻害がある程度回復した (Fig. 2-3c、2-3d)。しかし、1 µg/ml マンガン添加 MRS 培地を使用した場合は、パラコート添加の影響はどちらの菌株においても認められなかった (Fig. 2-3a、2-3b)。

次に、*L. casei* シロタ株と MS1001 のスーパーオキシド消去活性について、反応液に EDTA を添加した場合と、非添加の場合の両方で測定した (Fig. 2-4)。EDTA を添加したスーパーオキシド消去活性は酵素反応による活性を示し、一方で、EDTA を除いて測定したスーパーオキシド消去活性は、酵素反応と非酵素的反応 (マンガンによるスーパーオキシド消去) を合わせた活性を示している。その結果、EDTA を添加した反応液を用いた *L. casei* シロタ株の活性は検出できなかったが、MS1001 の活性は検出でき、マンガン濃度に関わらず 10 U/mg protein 以下程度のほぼ一定の値であった。しかし、EDTA を除いた反応液を用いた場合、両菌株とも培地に添加したマンガン濃度に依存してスーパーオキシド消去活性が上昇した。特にマンガンが豊富な培地においては、マンガンに由来するスーパーオキシド消去活性は酵素に由来する活性よりも著しく高かった (Fig. 2-4)。

2.3.4 マンガン蓄積におけるマンガントランスポーターの影響

次にスーパーオキシド消去活性に大きく寄与するマンガンのトランスポーターに焦点をあてた。*L. casei* シロタ株のゲノム上に 1 つの ABC 型のマンガントランスポーター

(*mtsCBA*) および 3 つの NRAMP 型マンガントランスポーター (*mntH1*, *mntH2*, *mntH3*) を見出した。しかし、*L. plantarum* で報告されていた P-type ATPase である *mntA* と相同性の高い配列はゲノム上に存在しなかった。ゲノム上に存在したトランスポーターの役割を明らかにするために、*mntH1*, *mntH2*, *mntH3*, および ABC 型トランスポーターの溶質結合タンパク質をコードする *mtsA* 遺伝子を、単独、またはいくつか組み合わせて破壊した。次に、得られた変異株および野生株を種々のマンガンの濃度の MRS 培地で一晩培養し、菌体内のマンガンの濃度を測定した (Fig. 2-5)。野生株はマンガンの濃度依存的にマンガンを取り込んだ。マンガンの濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の培地においては、培地中のほぼすべてのマンガンを菌体内に取り込んでいた。しかし、高いマンガンの濃度の培地では、取り込み量の増加は緩やかになった。マンガントランスポーター遺伝子の単独破壊株 (TM1002, TM1003, TM1004) においては、マンガンの高濃度の培地を用いた場合にばらつきが見られたが、野生株と同等の値を示し、マンガンの取り込みにはほぼ影響は認められなかった。一方で 2 つの遺伝子を破壊した TM1005 ($\Delta\text{mntH1}/\Delta\text{mntH2}$) はマンガンの取り込み量が大きく減少した。さらに、3 つの遺伝子を破壊した TM1011 ($\Delta\text{mntH1}/\Delta\text{mntH2}/\Delta\text{mtsA}$) は、マンガンの濃度が 3 $\mu\text{g/ml}$ 以下では致死的であり、マンガンの取り込みを確認することができなかった。しかし、マンガンの高濃度の場合は、TM1011 は僅かな生育が可能であり、微弱なマンガンの取り込み活性も認められた。一方、他の組み合わせの 3 遺伝子破壊株である TM1012 ($\Delta\text{mntH1}/\Delta\text{mntH2}/\Delta\text{mntH3}$) は TM1005 ($\Delta\text{mntH1}/\Delta\text{mntH2}$) とほぼ同様な挙動を示した。

2.4 考察

SOD はスーパーオキシドを不均化する酵素であり、酸素毒性に対する防御機構として非常に重要である。*Lactobacillus casei* においては、SOD 活性を示さずその代わりに菌体内に蓄積したマンガンのスーパーオキシドの消去をしているという報告 [9, 10]がある一方で、SOD 遺伝子をコードしその活性を検出している相反する報告[37]が存在した。*L. casei* シロタ株のゲノム情報を調べたところ、*sodA* 遺伝子が存在することが明らかとなった。相同性解析だけでは何型の SOD に属するのか同定するには至らなかったが、推定アミノ酸配列は、他の細菌のマンガニン型、鉄型、鉄/マンガニン型の SOD 配列と高い相同性があり、金属リガ

ドや活性部位のアミノ酸配列は保存されていた。しかし、*L. casei* シロタ株や大腸菌において、シロタ株の *sodA* を発現させたところ、その活性を検出することはできなかった。陽性対照として使用した *L. lactis* 由来の SOD 活性はシロタ株で検出できたこと、そして、大腸菌で発現させたシロタ株の SOD は可溶性画分に確認できることから、シロタ株の SOD はタンパク質が合成されても機能しないと考えられた。

L. casei や *L. plantarum* において、菌体内に蓄積したマンガンがスーパーオキシド消去活性を持つとされているのは、透析や EDTA 処理でその活性が失われ、さらにマンガンを追加することでその活性を回復するという実験結果に基づいたものである[9, 10]。本研究においてもシロタ株の SOD 活性は EDTA 添加によってその活性が失われるが、EDTA を添加しない場合は、培地へ添加したマンガン濃度依存的に SOD 活性が高まり、菌体内のマンガン濃度の増加と相関が認められた (Fig. 2-4、2-5)。さらに、野生株と MS1001 (*L. lactis* SOD 導入株) のスーパーオキシド耐性を調べたところ、マンガン無添加の培地で培養したときのみ観察されたパラコート添加による野生株の生育阻害を、*L. lactis sodA* の発現により部分的に回復させた (Fig. 2-3)。このことは、MS1001 において、マンガンと SOD の両者がスーパーオキシド毒性の回避に関与していることを意味している。しかし、MS1001 の *L. lactis sodA* 由来の酵素活性が菌体内のマンガンによるスーパーオキシド消去活性と比較して著しく小さかった (Fig. 2-4) ために、培地に十分マンガンが含まれている場合は、*L. lactis* の SOD の効果が見られなかったのではないかと考えられた。乳酸菌において異種 SOD の発現により酸化ストレス耐性が向上した報告はいくつかある[52, 53]が、もともと酸化ストレスに感受性の菌種や、スーパーオキシド消去活性を持たない宿主の報告が多い。よって本研究の結果も、合理的なものであると考えている。また進化の過程において、シロタ株は *sodA* 遺伝子を有しているが、菌体内に蓄積したマンガンによるスーパーオキシド消去活性が酵素由来の活性と比較しても十分高く酵素による活性を代替することが可能であったため、シロタ株は SOD の酵素活性を失ったのではないかと推察された。

一方、SOD 活性を示すとされる *L. casei* が報告されている[37, 54]。筆者らの結果は、SOD 活性を示さず Archibald らの結果[9, 10]を支持するものであったが、Lin らの結果[54]との相違の原因についてはよくわからなかった。可能性として、SOD 活性の測定方法が異なることが挙げられる。特に遊離のマンガンがスーパーオキシド消去活性を持ち、見かけの SOD

活性に大きな影響を与えることから、EDTA の添加によりその影響を排除することが重要である。この問題の結論を導くには同一の測定方法を用いて比較することも必要であると考えられた。

そして、次に *L. casei* シロタ株のマンガン取り込み機構について解析した。単独の遺伝子破壊株ではほとんど表現型に影響が認められず、複数の遺伝子破壊によって初めて影響が認められたことから、複数の遺伝子が相補的に機能していることが示唆された (Fig. 2-5)。 $\Delta mntH1/\Delta mntH2$ の 2 つの遺伝子破壊株でマンガンの取り込み量が著しく抑制され、それらに加えて *mtsA* 遺伝子を破壊した 3 遺伝子破壊株では、培地中のマンガン濃度が 3 $\mu\text{g/ml}$ 以下では致死的であり、マンガン取り込みが不可能であった (Fig. 2-5) ことから、これら 3 遺伝子が主要なトランスポーターであることが示唆された。しかしながら、高濃度のマンガン存在下ではマンガンの僅かな取り込みと、生育が可能であったことから、他の遺伝子が関与しているのかもしれない。ただし、3 遺伝子破壊株の生育は著しく低下していることから、*mntH1*、*mntH2* にコードされる 2 つの NRAMP 型トランスポーターと *mtsCBA* の遺伝子クラスターにコードされる ABC 型のトランスポーターが、*L. casei* シロタ株において、細胞内マンガンの蓄積の原因となる主要なトランスポーターであると結論づけた。

以上のことから、*L. casei* シロタ株の SOD は不活化しており、複数のマンガントランスポーターによって蓄積した細胞内のマンガンが主としてスーパーオキシド消去に機能していることを明らかにした。

Table 2-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Genotype or phenotype	Source or reference
Strains		
<i>Lactobacillus casei</i>		
Shirota (YIT 9029)	Wild-type	Our collection
TM1002	Deletion in <i>mntH1</i> gene	This study
TM1003	Deletion in <i>mntH2</i> gene	This study
TM1004	Deletion in <i>mtsA</i> gene	This study
TM1005	Deletion in <i>mntH1</i> and <i>mntH2</i> gene	This study
TM1006	Deletion in <i>mntH1</i> and <i>mtsA</i> gene	This study
TM1010	Deletion in <i>mntH2</i> and <i>mtsA</i> gene	This study
TM1011	Deletion in <i>mntH1</i> <i>mntH2</i> and <i>mtsA</i> gene	This study
TM1012	Deletion in <i>mntH1</i> <i>mntH2</i> and <i>mntH3</i> gene	This study
MS1001	<i>attB</i> ::pYAP300- <i>LsodA</i> , Em ^r	This study
MS1002	<i>attB</i> ::pYAP300- <i>sodA</i> , Em ^r	This study
ATCC334	Strain isolated from cheese	ATCC
<i>Lactococcus lactis</i>		
ATCC19435	Type strain	ATCC
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	Commercial strain purchased from Toyobo Co., Ltd.	
K-12 HfrH	High frequency recombination strain of K-12	Our collection
BLR(DE3)	Commercial strain purchased from Merck Ltd.	
BSM4	BLR(DE3) harboring pET-21(+)- <i>sodA</i> M	This study
BES3	BLR(DE3) harboring pET-21(+)- <i>EcsodA</i>	This study
Plasmids		
pET-21(+)	Commercial plasmid purchased from Merck Ltd.	
pET-21(+)- <i>sodA</i> M	pET-21(+) carrying wild-type <i>sodA</i> with <i>E. coli</i> Shine-Dalgarno sequence	This study
pET-21(+)- <i>EcsodA</i>	pET-21(+) carrying <i>E. coli sodA</i> with <i>E. coli</i> Shine-Dalgarno sequence	This study
pYSSE3	<i>E. coli</i> cloning vector carrying pUC19 <i>ori</i> region, pAMβ1 erythromycin resistance gene and multicloning sites	Yasuda <i>et al.</i> (2008)
pYSSE3-Δ <i>mntH1</i> -del	pYSSE3 carrying upstream region with N terminus of <i>mntH1</i> and downstream region with C terminus of <i>mntH1</i>	This study
pYSSE3-Δ <i>mntH2</i> -del	pYSSE3 carrying upstream region with N terminus of <i>mntH2</i> and downstream region with C terminus of <i>mntH2</i>	This study
pYSSE3-Δ <i>mntH3</i> -del	pYSSE3 carrying upstream region with N terminus of <i>mntH3</i> and downstream region with C terminus of <i>mntH3</i>	This study
pYSSE3-Δ <i>mtsA</i> -del	pYSSE3 carrying upstream region with N terminus of <i>mtsA</i> and downstream region with C terminus of <i>mtsA</i>	This study
pYAP300	<i>E. coli</i> cloning vector carrying p15A <i>ori</i> region, pAMβ1 erythromycin resistance gene, phiFSW <i>attP</i> site and <i>int</i> , multicloning site and synthetic promoter sequence active in lactobacilli upstream of the multicloning site	Yasuda <i>et al.</i> (2008)
pYAP300- <i>LsodA</i>	pYAP300 carrying <i>L. lactis</i> ATCC19435 <i>sodA</i>	This study
pYAP300- <i>sodA</i>	pYAP300 carrying wild-type <i>sodA</i>	This study

Table 2-2. Primers used in this study

Target gene	Primer sequence (5'→3')		Restriction enzyme site
	Forward	Reverse	
Construction of deletion mutants			
<i>mntH1</i> -5'	TAT <u>TCTAGA</u> AGTGAGCGGTAAGCAG	TAT <u>CTGCAG</u> CGGTATCTTCGAAGTGAAT	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
<i>mntH1</i> -3'	AAT <u>CTGCAG</u> TGCTCATCTTCGCGAT	AATA <u>AAGCTT</u> TTGATGCATGGACA	<i>Pst</i> I/ <i>Hin</i> d III
<i>mntH2</i> -5'	AACA <u>AAGCTT</u> CTCCAGTGAGGACAG	TAA <u>GAGCTC</u> ACAATAACTCTCCCCT	<i>Hin</i> d III/ <i>Sac</i> I
<i>mntH2</i> -3'	ATAG <u>AGCTC</u> ACATCTTGACGCTGTAGC	TAA <u>TCTAGA</u> ACGGTGCCAGCCGCC	<i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I
<i>mntH3</i> -5'	CG <u>CGATCC</u> GTATCACAATGCCTAAAAG	CC <u>GGAATTC</u> ATAACCAACAGCAACCAAGG	<i>Bam</i> H I/ <i>Eco</i> R I
<i>mntH3</i> -3'	CC <u>GGAATTC</u> ATGTGACGGCTTTTCAAGG	GTT <u>GCTGCAG</u> CAATTGGCAGG	<i>Eco</i> R I/ <i>Pst</i> I
<i>mtsA</i> -5'	AAT <u>CTGCAG</u> GCTTGTATCGGAAGCT	TAT <u>GTCGAC</u> CCCTGCAACCATGGTT	<i>Pst</i> I/ <i>Sal</i> I
<i>mtsA</i> -3'	ATAG <u>TTCGAC</u> GGTTTGGCCGGAATA	TAAT <u>TCTAGA</u> GCAACGTTCCAAGTCTC	<i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I
Expression in <i>L. casei</i>			
<i>sodA</i>	TCC <u>CCCGGG</u> AAAGGTTGATTCCTATGAC	GCT <u>CTAGA</u> TCAGCGGTTTGATTCGGG	<i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I
<i>LlsodA</i>	TCC <u>CCCGGG</u> TAAAAGGAGAAATTAATACTATGG	GCT <u>CTAGA</u> TTATTTTGCTTTAGCATAAAG	<i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I
Expression in <i>E. coli</i>			
<i>sodA</i>	CGGGATCCaagaaggagatatacatATGACATTTGTTTTGCCAGAT	CCGCTCGAGGGCGTTTGATTCGGGATGC	<i>Bam</i> H I/ <i>Xho</i> I
<i>EcsodA</i>	CGGGATCCaagaaggagatatacatATACATATGAGCTATACCTGCCAT	CCGCTCGAGTTTTTTCGCCGCAAAACGTG	<i>Bam</i> H I/ <i>Xho</i> I

The restriction enzyme sites are indicated (underlined).

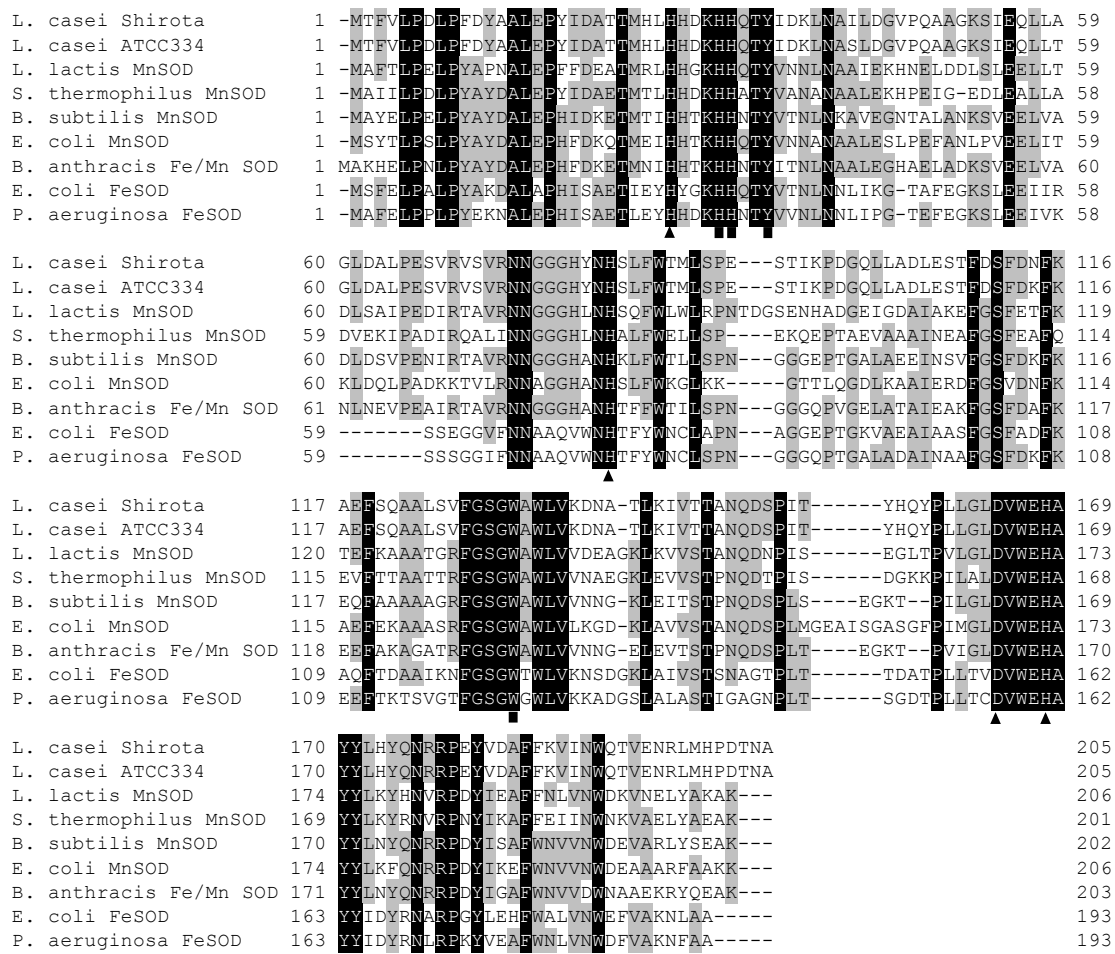
The sequences derived from pET21a(+) containing Shine-Dalgarno sequence are indicated by lowercase letters.

Table 2-3. SOD activity of lactic acid bacteria and *E. coli*

Strain	SOD activity (U/mg protein)	
	IPTG+	IPTG-
<i>L. casei</i> Shirota	ND	-
<i>L. casei</i> ATCC334	ND	-
<i>L. lactis</i> ATCC19435	45.1	-
<i>L. casei</i> MS1001	11.0	-
<i>L. casei</i> MS1002	ND	-
<i>E. coli</i> BES3 (20 °C)	-	100.4
<i>E. coli</i> BSM4 (20 °C)	-	32.8

ND: not detected.

Temperatures in parentheses are those when the gene expression was induced.



■ Putative active sites ▲ Putative metal ligands

Fig. 2-1. Multiple alignment of the amino acid sequences of superoxide dismutase in various species. The residues with black background represent residues conserved in all sequences; those with grey background represent residues conserved in at least 50% of all sequences. Putative active sites and putative metal ligands are indicated by square and triangle symbols, respectively.

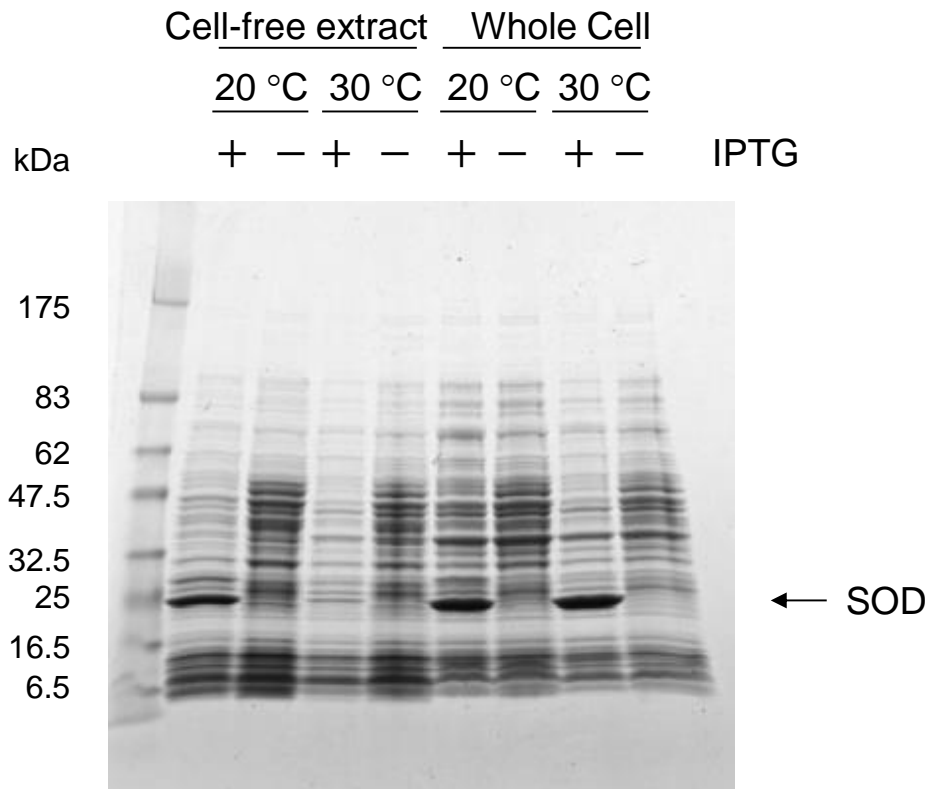


Fig. 2-2. SDS-PAGE analysis of *L. casei* strain Shirota SOD expression in *E. coli*. *Escherichia coli* BSM4 (harboring pET-21(+)-sodAM) was grown at 30°C in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin until OD₆₀₀=0.6. Then, IPTG (1 mM) was added for SOD induction and the culture was grown overnight at 20°C or 30°C. Concentrated protein precipitated from 50 µl of cell-free extracts by trichloroacetic acid and whole cells from 100 µl cultures were loaded on to the gel. The arrow indicates SOD proteins.

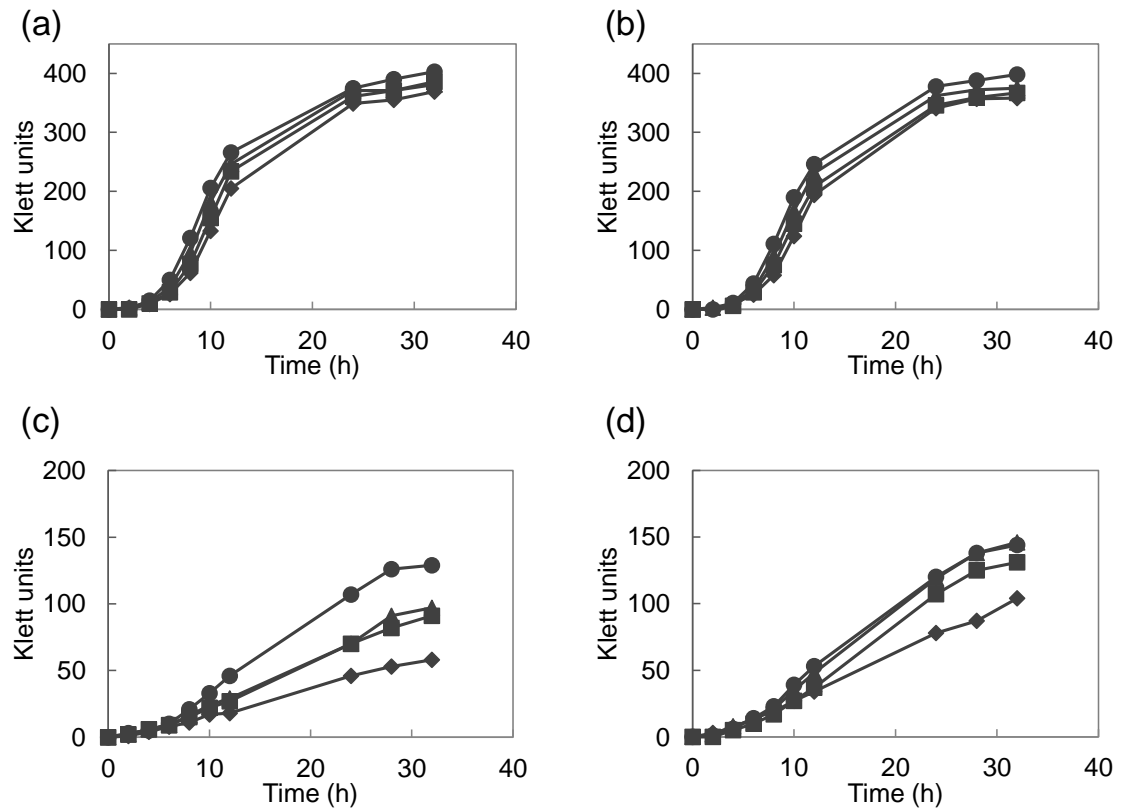


Fig. 2-3. Effect of paraquat on the growth of *L. casei* strain Shirota and *L. casei* MS1001 (expressing *L. lactis soda*). Overnight cultures grown in Mn-free MRS medium were inoculated at 1% (v/v) into Mn-free MRS medium with or without 1 µg/ml manganese. The growth of *L. casei* strain Shirota with manganese (a) or without manganese (c). The growth of *L. casei* MS1001 with manganese (b) or without manganese (d). ●, no paraquat; ▲, 0.5 mM paraquat; ■, 1.0 mM paraquat; and ◆, 2 mM paraquat.

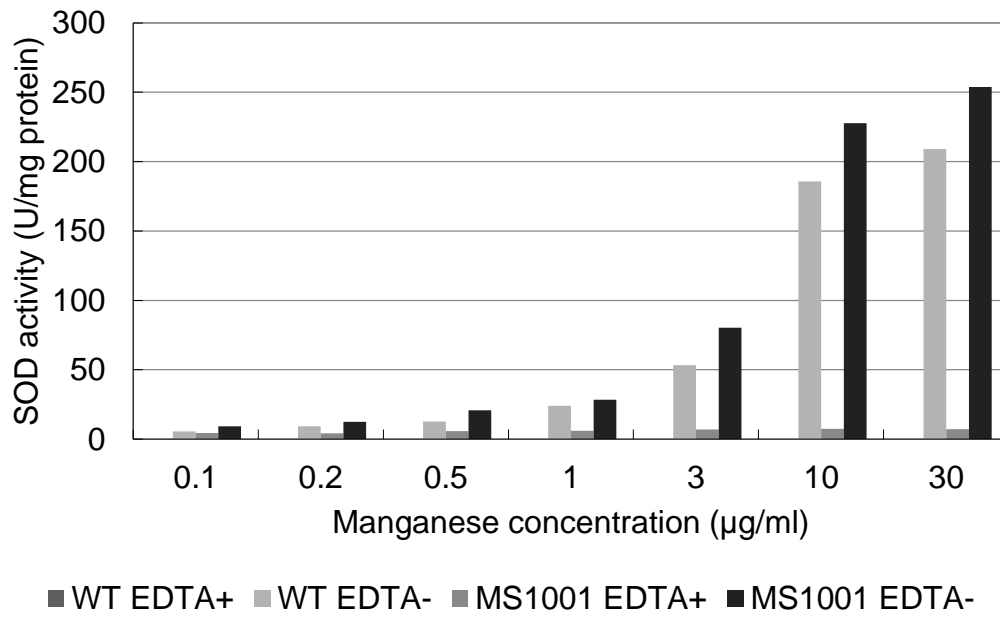


Fig. 2-4. SOD activity of *L. casei* strain Shirota (WT) and *L. casei* MS1001 (expressing *L. lactis sodA*). Cell-free extracts of cells grown overnight were measured with or without EDTA in the mixture.

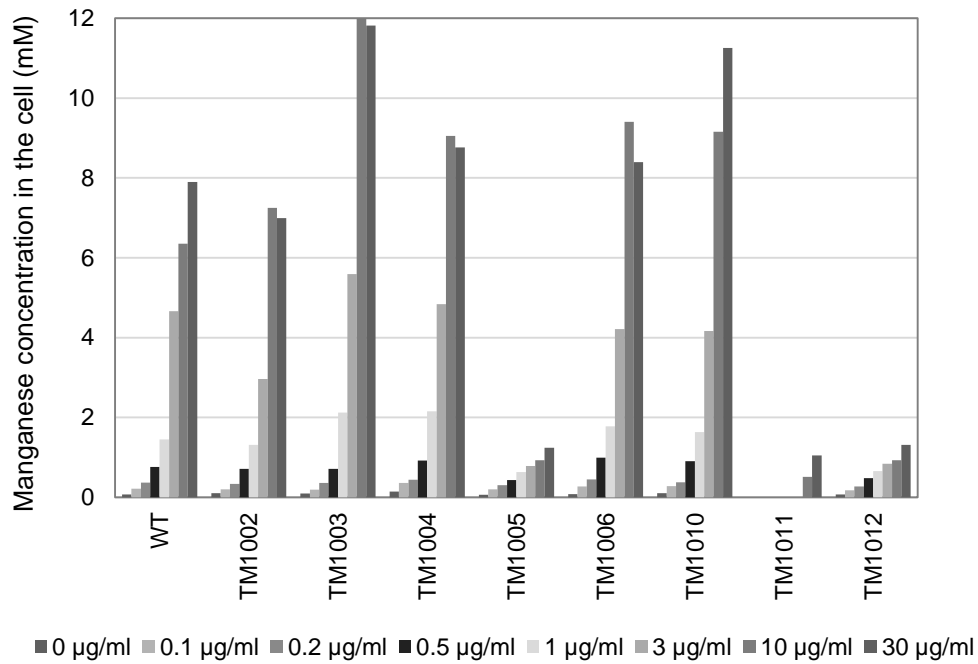


Fig. 2-5. Intracellular manganese accumulation by *L. casei* strain Shirota and manganese transporter-disrupted mutants. Cells were grown in Mn-free MRS medium to which was added various concentrations of manganese. Manganese concentrations in the cells are represented as mmol per the whole washed pellet volume.

第 3 章 *Lactobacillus casei* シロタ株の酸化ストレス耐性におけるチオレドキシシンとチオレドキシシンレダクターゼの役割

3.1 緒言

生細胞の内部は一般に還元状態に保たれている。酸化ストレスに対する感受性の原因として、細胞内のチオール基の酸化、またはチオール基への還元障害が挙げられる。チオレドキシシンは原核生物、真核生物の両者においてチオール/ジスルフィドバランスの維持に関与する小さなタンパク質であり[55]、当初は大腸菌において ribonucleotide reductase の電子供与体として特定された[56]。チオレドキシシンは細胞内の酸化還元プロセスにおいて、タンパク質の修復や酸化ストレスに対する防御を含めた重要な役割を果たしている[57]。チオレドキシシンはその活性中心に保存された CXXC モチーフを所有している。このモチーフは酸化型のジスルフィドと還元型のジチオールの両者の形に変化可能である。還元型のチオレドキシシンは酵素やタンパク質のジスルフィドをチオール基へと還元し、自らはジスルフィドの酸化型へと変化する。酸化されたチオレドキシシンはフラボプロテインであるチオレドキシシンレダクターゼによって NADPH を電子供与体として還元される[55, 58]。また、同様なシステムとして、大腸菌はチオレドキシシンに依存した還元システムだけでなく、グルタチオン-グルタレドキシシンに依存した還元システムを持っている。しかし、グルタチオンは *L. casei* を含む多くのグラム陽性細菌に存在しないとされており[59]、このことはそれらの生物では還元システムの中で、グルタチオンを生成することも利用することもできないことを示唆している。

L. casei シロタ株は、発酵乳の製造に使用されており、好気条件下で高い増殖性と良好な生残性を示す。このことは、この株において細胞内のチオール/ジスルフィドバランスを保つ還元システムが機能していることを示唆している。しかし、*L. casei* におけるチオール/ジスルフィドバランスの維持や、酸化ストレス耐性のメカニズムについてはほとんど調べられていなかった。また乳酸菌全般において酸素や活性酸素種の消去に関与する酵素の貢献に関しては広く研究が行われているが[4, 6, 13]、チオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼシステムの役割についての研究はほとんどない。よって本研究では、*L. casei* シロタ株

の好気条件下での生育や生存における、チオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼの役割について、*L. casei* シロタ株の遺伝子破壊株を用いて解析した。

3.2 材料と方法

3.2.1 菌株、プラスミド、培地、培養条件

本研究で使用した菌株とプラスミドは Table 3-1 に記載した。*L. casei* シロタ株 (YIT 9029) は野生株として使用した。*E. coli* JM109 (Toyobo) は形質転換のためのコンピテントセルとして使用した。プラスミド pYSSE3[47]は挿入失活変異、遺伝子欠失変異を導入するためのクローニングベクターとして使用した。乳酸菌は MRS 培地 (Becton Dickinson) を用いて 37°C で培養した。大腸菌は LB 培地[48]を用いて 37°C で培養した。エリスロマイシン (Abbott) は、必要に応じて、終濃度が乳酸菌には 20 µg/ml、大腸菌には 500 µg/ml となるよう培地に添加した。培養液の濁度は Klett-Summerson photoelectric colorimeter (Klett MFG) を用いて測定した。静置好気培養は、培地 4 ml を小試験管に入れてアルミキャップで蓋をした状態で培養し、通常の培養はこちらの方法で行った。好気培養は、培地 10 ml を枝付き大試験管に入れてシリコ栓で蓋をし、タイテック社振とう恒温槽を用いて 160 rpm で激しく振とうしながら培養した。嫌気培養は、20 分間煮沸した後、30 分間窒素を循環し飽和させた培地 4 ml を小試験管に入れて気層を窒素置換しブチル栓で蓋をした状態で培養した。*trxB* 破壊株は嫌気条件下で、また、野生株やその他の変異株は静置好気条件下で前培養した。野生株および変異株の増殖性試験は、独立して 3 回行った。データは 3 回の試験の平均値±SD で示した。増殖性試験のデータは Student の t 検定を用いて有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

3.2.2 挿入失活破壊株および遺伝子欠失破壊株の作製

挿入失活破壊のための組換えプラスミドは、次に記載する方法で構築した。鋳型とした *L. casei* シロタ株のゲノム DNA、Table 3-2 に示すプライマー、および KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて、標的とする遺伝子の両端を削除した断片を PCR で増幅した。増幅断片を Table 3-2 に示す適当な制限酵素で両端を切断した。増幅断片に対応する制限酵素であら

はじめ切断し、Alkaline Phosphatase (Calf intestine, Takara Bio)を用いて脱リン酸化した pYSSE3 と増幅断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara Bio) を用いてライゲーションし組換えプラスミドを作製した。組換えプラスミドは Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いて精製し、エレクトロポレーション法[47]を用いて *L. casei* シロタ株に導入した。エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入の詳細は 2.2.2 に記載した方法で行った。コロニーが検出されなかった場合は、20 µg/ml のエリスロマイシンおよび 5 mM のジチオスレイトール (DTT) を添加した MRS 平板培地にエレクトロポレーション後の菌液を塗布し、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌氣的に培養した。エリスロマイシン耐性のクローンを選択し、適当なプライマー (Table 3-2) を用いて PCR によってプラスミドの組込みを確認した。プライマーは、pYSSE3 のマルチクローニングサイトの上流と、染色体上の標的とした遺伝子の下流に作製したものを使用した。

trxA1、*trxA2* の二重破壊株を作製するために、エリスロマイシン感受性の *trxA1* 欠失破壊株を作製した。遺伝子欠失破壊株は、2.2.2 に記載した方法で取得した。プラスミド構築の際に使用したプライマーは Table 3-2 に示した。ここで得られたクローンは Table 3-2 に記載したプライマーを用いて遺伝子が欠失していることを PCR で確認した。このクローンに、上記の方法で *trxA2* の挿入失活用の組換えプラスミドを導入し、二重破壊株を作製した。

3.2.3 過酸化水素による増殖阻害

一晚培養した前培養液を 4 ml の MRS 培地に 1% (v/v) 接種した。静置好気 (野生株、MS108、MS109、および MS110) または、嫌気 (MS111) 条件にて、37°C で培養した。7 時間培養時点で、過酸化水素の終濃度が 0.5、1、2 mM になるよう過酸化水素を培養液に添加し、継続して培養した。培養液の濁度は Klett-Summerson photoelectric colorimeter (Klett MFG) を用いて経時的に測定した。

3.2.4 還元剤およびジアミドの添加試験

一晚培養した前培養液を還元剤またはジアミドを添加した 4 ml の MRS 培地に 1% (v/v) 接種した。菌株は 37°C にて、静置好気条件または嫌気条件 (ジアミド処理のみ) で培養した。還元剤とジアミドは以下に記載の濃度で培養液に添加した。DTT、1 mM ; グルタチオ

ン (GSH) 、1 mM ; システイン (Cys) 、1 mM ; ジアミド、1 または 5 mM。濁度は 24 時間培養後に測定した。実験は少なくとも 3 回独立に実施した。データは平均値±SD で示した。

3.2.5 酸素または過酸化水素ストレスの付与

酸素または過酸化水素処理することによって酸化ストレスを与えた。酸素処理は下記の通り実施した。100 ml の嫌気 MRS 培地で 7 時間培養した後 2 つに分け、一方を 300 ml 容三角フラスコに入れて、タイテック社製振とう恒温槽を用いて 160 rpm で 30 分振とう培養した。もう一方はコントロールとして、嫌氣的にさらに 30 分間培養した。過酸化水素処理は下記の通り実施した。100 ml の MRS 培地を 7 時間、静置好気培養した後 2 つに分け、一方には 0.5 mM となるよう過酸化水素を添加し 30 分継続して培養した。もう一方はコントロールとして、さらに 30 分間静置好気培養した。

3.2.6 RNA の調製

3.2.5 で酸素または過酸化水素で処理した培養液 2 ml を 2 倍量の RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) に添加して攪拌後室温で 5 分間インキュベートし、RNA を安定化した。5,000 × g で 10 分間遠心分離して集菌した後、15 mg/ml のリゾチーム (Sigma-Aldrich) 、および 0.05 mg/ml の N-アセチルムラミドイース SG (生化学工業) を含む TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 200 μl に懸濁し、時々ボルテックスで攪拌しながら室温で 10 分間インキュベートした。total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従って精製した。精製途中で RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて DNase 処理を行い、混入している DNA を分解した。すべての RNA サンプルについて、Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) を用いて品質に問題がないことを確認した。

3.2.7 定量的リアルタイム PCR 解析

1 μg の total RNA を鋳型とし、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて逆転写反応 (30°C 10 分間、42°C 50 分間、95°C 5 分間) を行い、cDNA を調製した。10² 倍希釈した cDNA 溶液を鋳型とし、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) とプライマー (Table 3-2) を添加し、7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、95°C 30 秒間反応

後 95°C 5 秒間、60°C 34 秒間を 40 サイクル反応させた。また、各遺伝子の発現量は 16S rRNA を内部標準とし、サンプル間の補正を行った。PCR 反応の特異性を確認するため、各反応後に融解曲線分析を行った。データは Sequence Detection Software (Applied Biosystems) を用いて解析し、内部標準と標的遺伝子の cDNA 溶液を 10^1 から 10^4 に段階希釈した標準直線を作成して、各遺伝子の発現量を求めた。結果は、非ストレスサンプルの発現量に対するストレスサンプルの発現量の相対値で表した。非ストレスサンプルとストレスサンプルの発現量は Student の t 検定を用いて有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

3.2.8 塩基配列、アミノ酸配列の解析

塩基配列、アミノ酸配列の相同性検索には、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX (ゼネティックス)、および BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用した。マルチプルアライメントは CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を使用した。

3.3 結果

3.3.1 *L. casei* シロタ株におけるチオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼシステム

相同性解析により、4 つのチオレドキシシン遺伝子と 2 つのチオレドキシシンレダクターゼ様遺伝子が、*L. casei* シロタ株のゲノム配列に存在することが分かった。*trxA1*、*trxA2*、*trxA3*、および *trxA4* と名づけた 4 つのチオレドキシシンは、チオレドキシシンやチオレドキシシンレダクターゼの共通な活性部位である、CXXC モチーフを保持していた。しかし、これら遺伝子の推定アミノ酸配列の相同性は、活性部位を除いては互いに低かった (Fig. 3-1)。2 つのチオレドキシシンレダクターゼ様遺伝子は、アミノ酸配列で互いに 29% の相同性を示したが、一方は CXXC モチーフを持っておらず、このタンパク質は酸化されたチオレドキシシンを還元するのではなく、なにか他の機能を持つことが示唆された。同様な配列は、*Lactobacillus* 属、*Lactococcus lactis*、および *Bacillus subtilis* のようなグラム陽性細菌で見られている。これらの中で、*B. subtilis yumC* の遺伝子産物は ferredoxin NADP+ reductase として機能することが知られており [60]、*L. casei* シロタ株の遺伝子産物と高い相同性 (47%) を示した。このことは、*L. casei* シロタ株の遺伝子産物も同じ機能を持つことを暗示している。したがって、

CXXC モチーフを持つ遺伝子を *trxB* と命名し、*yumC* と相同性の高い遺伝子は、本研究の以後の解析からは除外した。

ゲノム配列が公開されている *L. casei* もまた 4 つのチオレドキシシンと 1 つのチオレドキシシンレダクターゼ遺伝子を保有していたが、*L. casei* Zhang では *trxA4* 遺伝子が存在しなかった。*L. casei* シロタ株の 4 つのチオレドキシシンと 1 つのチオレドキシシンレダクターゼのアミノ酸配列は高度に保存されており、BL23、BD-II、および LC2W らとは完全に一致していた。それ以外の ATCC334、Zhang も *L. casei* シロタ株の配列と高い相同性を示していた (ATCC334 : 100% TrxA1、TrxA2、TrxA3、92% TrxA4、99% TrxB ; Zhang : 100% TrxA1、TrxA2、TrxA3、99% TrxB)。

3.3.2 遺伝子破壊株の作製と増殖性

チオレドキシシンとチオレドキシシンレダクターゼの酸化ストレス耐性における役割を明らかにするため、遺伝子破壊株を作製した。酸化ストレスおよび非酸化ストレスの両条件下で *trxA3* と *trxA4* の発現が僅かであったことから (未公開データ)、4 つのチオレドキシシンの中で *trxA1* と *trxA2* に焦点をあて、それらと *trxB* の破壊株を作製した。*trxA1*、*trxA2*、および *trxB* 破壊株 (MS108、MS109、MS111) は挿入失活により作製した。*trxA1 trxA2* 二重破壊株 (MS110) は、最初に *trxA1* を遺伝子欠失により破壊し、続いて *trxA2* を挿入失活により破壊して作製した。*trxA1* 破壊株および *trxA2* 破壊株は、好気条件下で容易に取得することができたが、*trxA1 trxA2* 二重破壊株および *trxB* 破壊株は、平板培地に 1 mM DTT を添加し、嫌氣的に培養することで初めて取得できた。*trxB* 破壊株は、その条件でさえも非常に小さなコロニーしか形成しなかった。

嫌気条件下において、MS108 および MS109 は、野生株と同様に生育したが、MS110 および MS111 は生育が有意に阻害された。MS110 は対数増殖期への移行の僅かな遅れであったが、MS111 は顕著に増殖速度が低下し、最終濁度が有意に低かった (Fig. 3-2b)。一方、好気条件下において、MS108 および MS109 は僅かな生育阻害が認められた。MS110 は、生育阻害と最終濁度の著しい低下が見られた (Fig. 3-2a)。また、MS111 は好気条件下で全く生育ができなかった (Fig. 3-2a)。これらの結果は、TrxB は好気条件下での生育に必須であるが、個々の TrxA は好氣的な生育に部分的、そして相補的に寄与していることが示唆された。

さらに、これらの遺伝子破壊株の酸化ストレスに対する感受性を解析した。遺伝子破壊株の生育における過酸化水素の影響を調べた。それぞれの変異株を MRS 培地で静置好気条件 (野生株、MS108、MS109、MS110) で、および嫌气的条件 (MS111) で生育させた。培養 7 時間後に、過酸化水素を添加した。その結果、野生株と変異株の生育は、過酸化水素濃度に比例して阻害された (Fig. 3-3)。その中で、MS109 は 1 mM の過酸化水素を添加しても生育が見られたが、MS108 の生育はその濃度で阻害された。MS110 は、MS108 および MS109 よりも過酸化水素の影響が大きく、0.5 mM の添加で大きく生育が阻害された。さらに MS111 においては、0.5 mM の添加で著しく生育が阻害された (Fig. 3-3)。これらの結果から、チオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼシステムが過酸化水素耐性にも重要な役割を果たすことが示唆された。

3.3.3 遺伝子破壊株の生育における、還元剤の影響

遺伝子破壊株の生育阻害がチオール/ジスルフィドのバランスが崩れたことによるかどうかを調べるために、培地にチオール化合物を添加した。Fig. 3-4 にジチオスレイトール (DTT)、還元型グルタチオン (GSH)、システイン (Cys) が野生株と遺伝子破壊株の増殖性に与える影響を示した。静置好気条件で、1 mM のチオール化合物を添加し、MRS 培地で培養し、24 時間培養後の濁度を測定した。野生株および MS108 においては、すべての化合物の添加の影響は見られなかった。MS110 および MS111 の化合物無添加培地における生育阻害が、DTT および GSH の添加により回復した。特に、MS111 の増殖性は、これらの化合物により劇的に回復した。一方、システインの添加によって、MS109、MS110、MS111 の増殖性が逆に悪化した (Fig. 3-4)。これらの結果から、チオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼシステムが欠損した変異株の生育阻害は、チオール/ジスルフィドのバランスの崩れによることが示唆された。また、システインがこれら変異株に毒性を示すことが示唆された。

3.3.4 ジアミド感受性

ジアミドはチオール酸化剤であり [61]、嫌気条件下において酸素暴露による影響を模倣できる。静置好気条件下、および嫌気条件下の遺伝子破壊株の生育や生存における、ジアミド添加の影響を解析した。野生株においては、1 mM、および 5 mM のジアミド添加で僅かに

増殖性が影響を受けた (Fig. 3-5)。MS108 および MS109 においては、ジアミド添加で中程度に影響を受けた。しかし、MS110 および MS111 においては、ジアミドに対して強い感受性を示し、嫌気条件下においても 5 mM 添加で生育が完全に阻害された。これらのことから、チオレドキシソ-チオレドキシソレダクターゼシステムは、静置好気条件および嫌気条件の両条件下で、還元状態を保つよう細胞内のチオール/ジスルフィドのバランスの維持に重要な役割を果たしていることが、示唆された。

3.3.5 チオレドキシソ、チオレドキシソレダクターゼ遺伝子の発現解析

チオレドキシソおよびチオレドキシソレダクターゼの遺伝子が、酸化ストレスによって誘導されるかどうかを調べるため、これらの遺伝子の酸素および過酸化水素に暴露した後の遺伝子発現をリアルタイム PCR 解析によって調べた。さらに、他の抗酸化遺伝子と比較するため、酸素除去に働く水生成型 NADH オキシダーゼ (*nox2*)、および過酸化水素除去に働く NADH ペルオキシダーゼ (*npx*) の遺伝子発現量もそれぞれ調べた。これらのデータは、それぞれの非ストレスコントロールに対する発現比として表した (Fig. 3-6)。過酸化水素添加後の *trxA1*、*trxA2*、および *trxB* の発現は、僅かであるが、有意に増加した。その他の過酸化水素処理後の遺伝子および、酸素処理後のすべての遺伝子の遺伝子発現量は有意な変化は認められなかった。一方、NADH オキシダーゼ遺伝子は、酸素処理によって、NADH ペルオキシダーゼ遺伝子は酸素と過酸化水素の両ストレス処理によって有意に発現量が増加した。

3.4 考察

チオレドキシソ-チオレドキシソレダクターゼシステムや、グルタチオン-グルタレドキシソシステムは、多くの原核および真核細胞のチオール/ジスルフィドバランスを制御し、生命を維持するのに重要な役割を果たす[58]。グルタチオンを合成しない細菌において、チオレドキシソ-チオレドキシソレダクターゼシステムが唯一のチオール/ジスルフィドの酸化還元状態を制御するシステムであると考えられている。*B. subtilis* のチオレドキシソや、*Staphylococcus aureus* のチオレドキシソレダクターゼは、その生存に必須であることが報告

されている[62, 63]。さらに、*Bacteroides fragilis* のチオレドキシソレダクターゼの破壊株は、還元剤の添加無しでは生育ができない[64]。乳酸菌においては、*L. plantarum* WCFS1 のチオレドキシソレダクターゼの高発現によって酸化ストレスに対する耐性が改善することが報告されている[65]。

本研究において、*L. casei* シロタ株のチオレドキシソレダクターゼを欠損させた変異株は、好気条件下で生育ができないが、一方で、*trxA1*、*trxA2* の破壊株、あるいは *trxA1 trxA2* の二重破壊株の生育は、部分的に影響を受けるが生育可能であることを示した (Fig. 3-2)。また、好気条件下での致死的な影響と対照的に、MS111 は嫌気条件下ではある程度生育が可能であった。Rocha らは、*B. subtilis* のチオレドキシソレダクターゼ破壊株が半合成培地では生育できないが、栄養培地では生育が可能であることを報告している[64]。この理由として、嫌気条件下での生育は培地中のチオール化合物の存在により可能となっていることを示唆すると述べている。したがって、MS111 の嫌気条件下での生育は、培地中に含まれるグルタチオンのようなチオール化合物による可能性もありうる。しかし、この仮説の検証については、化学合成培地を用いた更なる試験が必要である。

DTT や GSH はチオール化合物であり、ジスルフィドの還元が可能である。本研究において、DTT は GSH よりも効果的に、MS110 および MS111 の生育を回復した。DTT は強力な還元剤であることが知られており、ジスルフィド結合を持つ化合物を還元することが可能である。一方で、GSH の還元能力はいくらか弱く、このことは、他のグルタチオンレダクターゼやグルタレドキシソンのような因子の関与も影響しているのかもしれない。

GSH は、*L. casei* を含む多くのグラム陽性細菌で合成されないとされている[59]。*Listeria monocytogenes* や *Streptococcus agalactiae* において、 γ -glutamylcysteine ligase (GshA) ドメインと ATP-grasp ドメインからなる融合タンパク質 (GshF) をコードする GSH 合成遺伝子[66, 67]が報告され、*L. casei* シロタ株で機能するか否かは不明であるが、そのホモログがゲノム上に存在することは確認した。しかし、静置好気条件下における *trxB* 破壊株の生育阻害が GSH 添加により回復する (Fig. 3-4) という事実は、*L. casei* シロタ株は十分な GSH を合成できていない可能性が考えられ、GSH の添加無しではグルタチオン-グルタレドキシソシステムが機能していないことが示唆された。それに加えて、*trxB* 破壊株である MS111 は、嫌気条件下においてもチオール酸化剤であるジアミドに感受性であることを示した (Fig. 3-5)。

チオレドキシソレダクターゼは酸化型から還元型のチオレドキシソに再生するのに必須であるため、チオレドキシソレダクターゼ破壊株においてチオレドキシソが機能することはできない。以上より、これらの結果はチオレドキシソ-チオレドキシソレダクターゼシステムが *L. casei* においてチオール/ジスルフィドのバランスの維持に主要な役割を果たしていることを示している。

多くの細菌は複数のチオレドキシソ遺伝子を持つことが報告されている [65, 68-70]。 *L. casei* シロタ株や、*L. casei* Zhang を除く多くの *L. casei* は4つのチオレドキシソを持つ。 *trxA1* 破壊株である MS108 および *trxA2* 破壊株である MS109 は、その程度に差があるものの、酸化ストレスに対して僅かに感受性となった。 *trxA1* *trxA2* の二重破壊株である MS110 は MS108 や MS109 よりも酸化ストレスに対してさらに感受性となった。 *trxB* 破壊株である MS111 は MS110 よりもさらに酸化ストレスに対して感受性であった。これらの結果から、 *trxA1* と *trxA2* の失活の影響は相加的であり、残りの *trxA3* または *trxA4* もまた細胞内のチオール/ジスルフィドのバランス維持に部分的に貢献していると考えられた。植物細胞においては、異なる型のチオレドキシソを持っており [71]、 *in vitro* でチオレドキシソは基質特異性が異なること [72] が報告されている。 *L. casei* シロタ株においても、4つのチオレドキシソのアミノ酸配列の相同性がお互いに高くないこと (Fig. 3-1)、また MS108 と MS109 の挙動が異なること (Fig. 3-3, 3-4, 3-5) から、それぞれのチオレドキシソは基質が異なる可能性がある。しかし、この仮説を検証するには、さらなる解析が必要である。

遺伝子破壊株の生育における、還元剤の影響を検討した試験において、予想外に MS109、MS110、および MS111 の生育が、1 mM のシステインの添加によって阻害された (Fig. 3-4)。この結果は、 *L. lactis*、 *B. fragilis*、および *B. subtilis* 等において、システイン添加によりチオレドキシソ、またはチオレドキシソレダクターゼ破壊株の増殖性を改善したとする報告 [64, 73, 74] と一致しなかった。また Vido らは、シスチンは *L. lactis* の *trxB* 破壊株の増殖性に影響を与えなかったと報告している [74]。嫌気条件下で、シスチンを MS110 および MS111 の培養液に添加したところ、その生育が阻害された (結果は示さず)。従って、 *L. casei* においては、チオレドキシソまたはチオレドキシソレダクターゼ破壊株の増殖性に対して、システインとシスチンの両者が阻害効果を持つことがわかった。システインの毒性についてはいくつかが報告があり、例えばシステインが threonine deaminase の酵素反応を阻害すること [75]、

システインが Fe^{3+} を Fe^{2+} へ還元することにより、フェントン反応によるヒドロキシルラジカル生成を亢進し DNA にダメージを与えること[76]、等がメカニズムとして挙げられている。チオレドキシシン破壊株では、ジスルフィドの還元よりもこれらのシステインの毒性が強く影響した可能性もある。しかし、これらだけではその要因を十分説明できず、*L. casei* シロタ株のシステインの毒性について解明するためには、更なる検討が必要であると考えている。

遺伝子発現解析において、*trxA1*、*trxA2*、および *trxB* 遺伝子が、過酸化水素ストレスによって僅かに発現促進が観察されたのみで、酸素ストレスによってはすべてのチオレドキシシンとチオレドキシシンレダクターゼ遺伝子の発現に影響は認められなかった (Fig. 3-6)。しかしながら、多くの細菌で、酸化ストレスによりこれらの遺伝子が発現促進することが報告されている。例えば *B. fragilis* においては、チオレドキシシン遺伝子である *trxC*、*trxE*、*trxF*、および *trxG* は好気的な条件で発現促進し、チオレドキシシンレダクターゼ遺伝子は過酸化水素または酸素により発現促進している[64, 70]。急激な酸化ストレスに対して自身を保護するために、*L. casei* は酸素や過酸化水素を除去するシステムである NADH オキシダーゼや NADH ペルオキシダーゼを直ちに誘導することが明らかとなった。このことは、通性嫌気性菌である *L. casei* は、酸素や過酸化水素の暴露など強い酸化ストレス条件下で NADH オキシダーゼや NADH ペルオキシダーゼ等の酵素が必要であり、一方で、チオレドキシシンは好気条件または嫌気条件にかかわらず、酸化還元に関与する細胞内タンパク質の還元状態の維持に常に必要であることを示しているのかもしれない。

以上のことから、*L. casei* のチオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼシステムは、酸化ストレスの強弱にかかわらず、細胞内のチオール/ジスルフィドバランスを維持することによって生命を持続するために、極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

結論として、本研究において、*L. casei* シロタ株の好気的な生育にチオレドキシシン-チオレドキシシンレダクターゼシステムが必須であり、細胞内のチオール/ジスルフィドバランスを維持する主たるシステムであることを示した。

Table 3-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or phenotype	Source or reference
Strains		
<i>L. casei</i>		
Shirota (YIT 9029)	Wild-Type	Our collection
MS108	<i>trxA1</i> ::pYSSE3- Δ <i>trxA1</i> , Em ^r	This study
MS109	<i>trxA2</i> ::pYSSE3- Δ <i>trxA2</i> , Em ^r	This study
MS110	Deletion in <i>trxA1</i> gene, <i>trxA2</i> ::pYSSE3- Δ <i>trxA2</i> , Em ^r	This study
MS111	<i>trxB</i> ::pYSSE3- Δ <i>trxB</i> , Em ^r	This study
<i>E. coli</i>		
JM109	Commercial strain purchased from Toyobo	
Plasmids		
pYSSE3	<i>E. coli</i> cloning vector carrying pUC19 <i>ori</i> region, pAM β 1 erythromycin resistance gene and multicloning sites	Yasuda <i>et. al.</i> (2008)
pYSSE3- Δ <i>trxA1</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>trxA1</i>	This study
pYSSE3- Δ <i>trxA2</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>trxA2</i>	This study
pYSSE3- Δ <i>trxB</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>trxB</i>	This study
pYSSE3- Δ <i>trxA1</i> -del	pYSSE3 carrying upstream region with N terminus of <i>trxA1</i> and downstream region with C terminus of <i>trxA1</i>	This study

Table 3-2. Primers used in this study

Target gene	Primer sequence (5'→3')		Restriction enzyme site	
	Forward	Reverse	Forward	Reverse
Construction of insertion mutants				
<i>trxA1</i>	CCG <u>GAA</u> TTCTGGCGTCAACCTAACAGAT	TAGTCTAGATGATAGCCAACAAGCTTCTC	<i>Eco</i> R I	<i>Xba</i> I
<i>trxA2</i>	CGGGATCCGCAGATTGGTGTCTGGATTG	AAA <u>CTGCAG</u> CGTTAAAGGCAATAAAGCTC	<i>Bam</i> H I	<i>Pst</i> I
<i>trxB</i>	CGGGATCCGGCTAAAGCGATTGTCAATTG	AAA <u>CTGCAG</u> AACCATGCTCATCCAGAACA	<i>Bam</i> H I	<i>Pst</i> I
Confirmation of insertion mutants				
<i>trxA1</i>	TTAAGTTGGGTAAACGCCAGG	ACTGTGTGCCTTCATAATCG		
<i>trxA2</i>	TTAAGTTGGGTAAACGCCAGG	ACGCTGGTTGATTATAACTG		
<i>trxB</i>	TTAAGTTGGGTAAACGCCAGG	AATCAAGCTTTAATCTCAATA		
Construction of deletion mutants				
<i>trxA1</i> -5'	CCG <u>GAA</u> TTCCGATAAAAATCATCAAGCAAC	CCC <u>AAGCTT</u> GGTTTCCGTCCTTGATGTTG	<i>Eco</i> R I	<i>Hin</i> d III
<i>trxA1</i> -3'	GAG <u>AAGCTT</u> GTTGGCTATCAAAC	TAGTCTAGACAATTCACGCTTTAGAACT	<i>Hin</i> d III	<i>Xba</i> I
Confirmation of deletion mutants				
<i>trxA1</i>	AAGGACAAGGCCAACTCGTT	ACTGTGTGCCTTCATAATCG		
qRT-PCR				
<i>trxA1</i>	CGGCCCTTGCCGGATGCA	TTTCTGCCAATTGTCGATGAC		
<i>trxA2</i>	AACCAAGCTATGCCTGAAATTGAG	GCGATCAACCGCGATGA		
<i>trxA3</i>	GGCATTATGTCAATCCCACT	GGTAAACACCTGTCACTTTTCGC		
<i>trxA4</i>	GGCAAAGTGGTACCGCAGTA	CCAGCCAGCACTTTGTCGAT		
<i>trxB</i>	CCGGCCCAAGTGGTATG	CAGCATCAGCACAGATAAAATTGG		
NADH oxidase	CGACCATGCCGGTACA	CGTACACGGTGACGTCAATAATCA		
NADH peroxidase	CGGCAATCAATGCTGATGTG	CTGCGTCGTGCCGTCT		
16SrRNA	TGGTTGTCGTACGCTCGTG	TCTTACTAGATGCCCAACT		

The restriction enzyme sites are indicated (underlined).

```

trxA1      1  -----MVQAVTDSNYKTETD TGVTLTDF 23
trxA2      1  -----MLAMKELGSNAAILNEVKQPGKMLFF 27
trxA3      1  -----MAIEATKDNLKALTAEGTVVVDF 23
trxA4      1  -----MKHPFRHFLINTVIGVVIATASLSALYVYAPKAMINVATPITINAQKKDQYILY 54
Ec trxA    1  -----MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDF 28
Ec trxC    1  MNTVCTHCQAINRIPDDRIEDAAKCGRCHDLFDGEVINATGETLD-KLLKDDL PVVIDF 59

trxA1      24  WATWCGPCRMQSPVIDKLAESRDD-VKFKMDVDANPETPKSFGIMAIPTLVIKKDGEEVV 82
trxA2      28  SADWCSDCRFIKPAMPEIEKDFSD-YEFIAVDRDKNLEVAQDMGVFGI PSFIAFNDGKET 86
trxA3      24  WAPWCGPCKVLDPMLTALEQELPA-LKVRYNVEKDHTLPSTMGIMSVP TLVIYQQGEAR 82
trxA4      55  YSPTGFPVCQQVYRTY--FWRSVTGQLKFASVTNEQNREAAAALG ITKVPTLVHYKKGKVV 112
Ec trxA    29  WAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGI RGIPTLLLFRNGEVA 88
Ec trxC    60  WAPWCGPCRNFAPIFEDVAQERSGKVRFEVKVNTEAERELSSRF GIRSIPTIMI FRNGQVV 119

trxA1      83  EKLVG YQTKDQLESTLNKYTA-- 103
trxA2      87  GRFVNKDRKTKQVEDFINGLH- 108
trxA3      83  EKVTG VYPKDKLKRYFEQKLEA- 104
trxA4     113  TQYTG QREQQIDKVLAGGKAGEH 135
Ec trxA    89  ATKVG ALSKGQLKEFLDANLA-- 109
Ec trxC   120  DMLNG AVPKAPFDSWLNESL--- 139

```

Fig. 3-1. Multiple alignment of the amino acid sequences of *L. casei* strain Shirota thioredoxin and *E. coli* thioredoxin. The residues with a black background represent residues conserved in all sequences; those with a grey background represent residues conserved in at least 50% of all sequences. The CXXC active site is indicated by thick line.

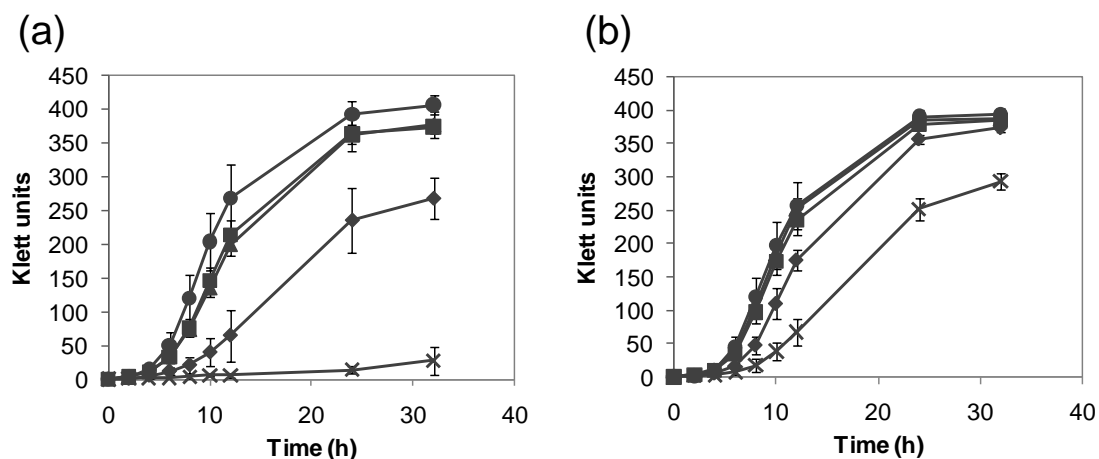


Fig. 3-2. Growth of *L. casei* strain Shirota and gene disruption mutants under aerobic (a) or anaerobic (b) conditions. Overnight MRS cultures were inoculated into fresh MRS cultures. ●, wild-type strain; ▲, MS108 (*trxA1* mutant); ■, MS109 (*trxA2* mutant); ◆, MS110 (*trxA1 trxA2* double mutant); ×, MS111 (*trxB* mutant). The data are means±SD of three independent experiments. Time points when the turbidity of mutants were significantly lower than that of the wild-type were as follows: MS109 32 h (aerobic conditions), MS110 4–32 h (aerobic conditions) and 6–32 h (anaerobic conditions), MS111 4–32 h (aerobic conditions) and 6–32 h (anaerobic conditions) (Student's *t*-test $P < 0.05$).

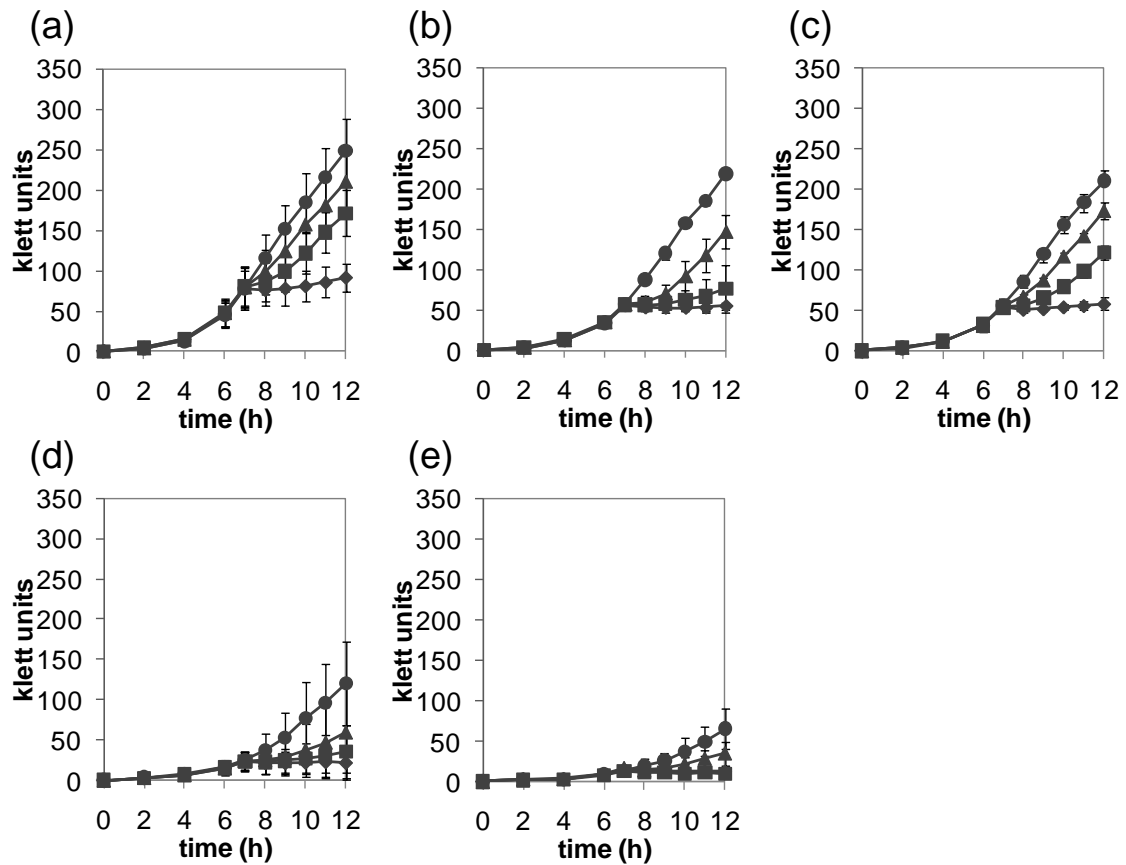


Fig. 3-3. Effect of adding hydrogen peroxide on the growth of *L. casei* strain Shirota and gene disruption mutants. (a) Wild-type, (b) MS108 (*trxA1* mutant), (c) MS109 (*trxA2* mutant), (d) MS110 (*trxA1 trxA2* double mutant) and (e) MS111 (*trxB* mutant). Strains were grown in MRS broth under static aerobic (wild-type, MS108, MS109 and MS110) or anaerobic (MS111) conditions. Hydrogen peroxide was added after 7 h of incubation. ●, no hydrogen peroxide; ▲, 0.5 mM; ■, 1.0 mM; ◆, 2.0 mM. The data are mean \pm SD of three independent experiments.

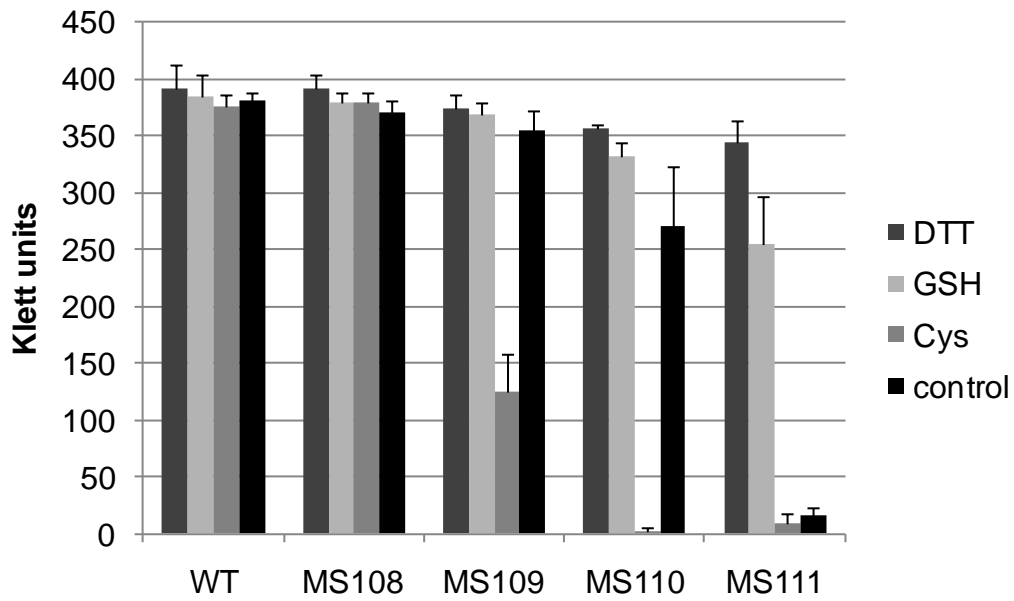


Fig. 3-4. Effect of adding reducing agents on the growth of *L. casei* strain Shirota and gene disruption mutants. Strains were grown in MRS cultures under static aerobic conditions with 1 mM DTT, GSH or Cys. Klett units were measured after 24 h incubation. The control had no agent added. The data are means \pm SD of at least three independent experiments. Strains: WT (wild-type), MS108 (*trxA1* mutant), MS109 (*trxA2* mutant), MS110 (*trxA1 trxA2* double mutant) and MS111 (*trxB* mutant).

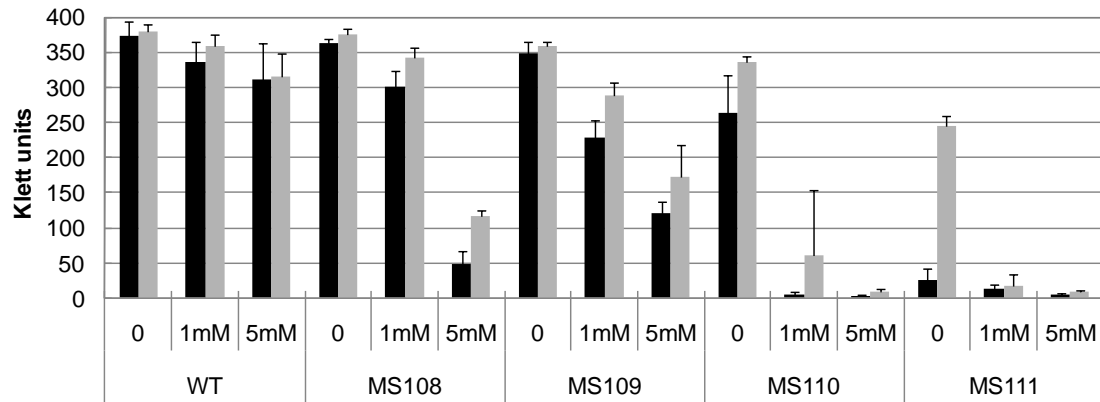


Fig. 3-5. Effect of adding diamide on the growth of *L. casei* strain Shirota and gene disruption mutants. Strains were grown in MRS under static aerobic condition (black bars) and under anaerobic condition (grey bars). Klett units were measured after 24 h incubation. The data are means \pm SD of at least three independent experiments. Strains: WT (wild-type), MS108 (*trxA1* mutant), MS109 (*trxA2* mutant), MS110 (*trxA1 trxA2* double mutant) and MS111 (*trxB* mutant).

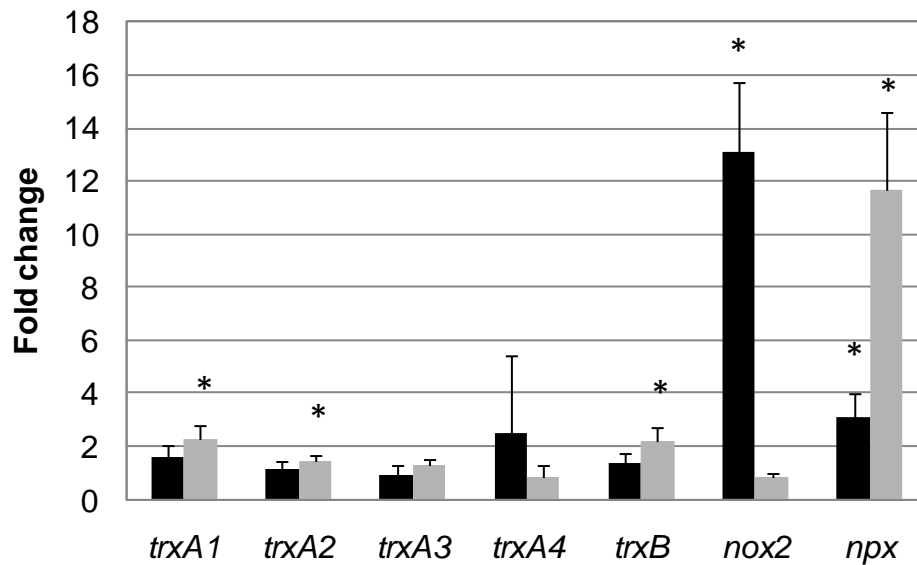


Fig. 3-6. Transcriptional analysis of thioredoxin and thioredoxin reductase genes. Bars represent the relative expression following exposure to oxygen compared with cells under anaerobic conditions (black bars) and the relative expression following exposure to hydrogen peroxide compared with cells under static aerobic conditions (grey bars). *L. casei* strain Shirota grown for 7 h under anaerobic condition was exposed for 30 min to oxygen provided by vigorous shaking at 160 r.p.m. *L. casei* strain Shirota grown for 7 h under static aerobic conditions was exposed for 30 min to 0.5 mM hydrogen peroxide. RNA was isolated from three independent experiments. Quantitative PCR was performed in duplicate for each of three independent samples. The gene expression values were normalized using 16S rRNA as internal standard. The results are shown as fold change compared with each control condition and are the means \pm SD of three independent experiments. Significant differences compared with unstressed control are indicated by an asterisk ($P < 0.05$).

第4章 *Lactobacillus casei* シロタ株の新規過酸化水素耐性遺伝子の機能解析

4.1 緒言

酸化ストレス耐性に関与する遺伝子の多くは、ストレスによって発現が変動すると考えられる。本研究では、*L. casei* シロタ株の酸化ストレス応答を明らかにし、酸化ストレス耐性に関与する新規な因子を探索するために、酸素または過酸化水素で処理したシロタ株のマイクロアレイ解析を実施した。また、酸素、過酸化水素の両ストレス条件下で共通して発現促進する遺伝子が、酸化ストレス耐性に強く関与する遺伝子と予想し、遺伝子の絞込みを行った。これらの発現促進遺伝子の中で、過酸化水素耐性 (hydrogen peroxide resistance) に関与していたことから、*hprA1* と名づけた機能不明な遺伝子に着目した。本研究では、酸化ストレス耐性における *hprA1* の関与を検証し、過酸化水素耐性のメカニズムを検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 菌株、プラスミド、培地、培養条件

本研究で使用した菌株とプラスミドは Table 4-1 に記載した。*L. casei* シロタ株 (YIT 9029) は野生株として使用した。*E. coli* JM109 (Toyobo) は形質転換のためのコンピテントセルとして使用した。*E. coli* BL21(DE3) (Merck) はタンパク質発現の宿主として使用した。プラスミド pYSSE3[47]は挿入失活変異を導入するためのクローニングベクターとして使用した。プラスミド pET-28b(+) (Merck) は、大腸菌において組換えタンパク質の発現ベクターとして使用した。乳酸菌は MRS 培地 (Becton Dickinson) を用いて 37°C で培養した。大腸菌は LB 培地[48]を用いて 37°C で培養した。エリスロマイシン (Abbott) は、必要に応じて、終濃度が乳酸菌には 20 µg/ml、大腸菌には 500 µg/ml となるよう培地に添加した。クロラムフェニコール (Sigma-Aldrich) は、必要に応じて、終濃度が乳酸菌には 5 µg/ml、大腸菌には 10 µg/ml となるよう培地に添加した。培養液の濁度は Klett-Summerson photoelectric colorimeter (Klett MFG) または DU800 spectrophotometer (Beckman Coulter) を用いて測定した。好気培養、静置好気培養、および嫌気培養は第3章に記載した方法で実施した。酸素ストレスの付

与には好気培養を、過酸化水素ストレスの付与には静置好気培養を用いた。

4.2.2 挿入失活破壊株の作製

挿入失活破壊株は第3章に記載した方法で実施した。プライマーは Table 4-2 に記載したものを使用した。

4.2.3 破壊遺伝子の相補

相補株作製に使用したプラスミド pYAP310 は、*L. casei* の染色体上の FSW フェージの *attB* サイトに遺伝子の組み込みおよび発現が可能な pYAP300 [47] の薬剤耐性遺伝子を pC194 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) に置換して作製した。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子断片は、pC194 を鋳型に Table 4-2 に示すプライマーを用いて PCR で増幅した。この遺伝子断片を *Bgl* II、*Fsp* I で処理し、同じ酵素であらかじめ処理した pYAP300 と連結した。

MS105 の相補は、Table 4-2 に示すプライマーを用いて増幅した *hprA1* 遺伝子を、pYAP310 に挿入し、得られたプラスミド (pYAP310-*hprA1*) を遺伝子破壊株の作製と同様の方法で MS105 に導入し、クロラムフェニコール耐性のクローンを取得した。

4.2.4 酸素または過酸化水素ストレスの付与

第3章に記載した方法で、*L. casei* シロタ株を酸素または過酸化水素処理し、酸化ストレスを与えた。

4.2.5 RNA の調製

4.2.4 で酸素または過酸化水素で処理した培養液から、第3章に記載した方法で RNA を調製した。

4.2.6 マイクロアレイ解析

60 mer のオリゴヌクレオチドをスポットしたマイクロアレイは、Takara Bio によって *L. casei* シロタ株のゲノム配列から設計および作製された。CyScribe First-Strand cDNA

Labelling Kit (GE Healthcare) を用いて 10 µg の Total RNA を添付のプロトコールに従って Cy3-dUTP または Cy5-dUTP で標識した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、添付のプロトコールに従って行った。洗浄したマイクロアレイは DNA microarray scanner G2505B (Agilent) を用いてスキャンし画像データを得た。得られた画像データから、DNASIS Array (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いてシグナル強度の数値化および解析を行った。Fold change の値は、非ストレス条件に対するストレス条件の発現比とし、2 回のレプリケートの平均値で表した。2 回のレプリケートのいずれにおいても 2 倍以上となった遺伝子、または 0.5 倍以下となった遺伝子をそれぞれ発現促進遺伝子、発現抑制遺伝子としてリスト化した (Table 4-3、4-4、4-5、4-6)。

4.2.7 定量的リアルタイム PCR 解析

定量的リアルタイム PCR 解析は第 3 章に記載した方法で実施した。プライマーは Table 4-2 に記載したものを使用した。

4.2.8 塩基配列、アミノ酸配列の解析

塩基配列、アミノ酸配列の相同性検索には、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX (ゼネティックス)、および BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用した。HprA1 のモチーフ・ドメイン検索には、InterProScan search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/ipscan/>) を使用した。系統樹解析は、CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を用いてアミノ酸配列をアライメントし、neighbour-joining method [77] を用いて系統樹を作製した。

4.2.9 過酸化水素処理後の生残性

一晚培養した菌液を遠心分離により集菌し、50 mM リン酸バッファー (pH 6.8) で洗浄後、10 倍量の同バッファーに懸濁した。0.5 mM の過酸化水素を添加した後、37°C で 3 時間反応させた。過酸化水素添加前と、添加 3 時間後の生菌数を MRS 平板培地を用いて測定し、生残率を算出した。

4.2.10 過酸化水素消去活性の測定

一晚 MRS 培地で培養した前培養液を 1% (v/v) 4 ml の MRS 培地に接種した。静置好気条件下で、菌株を 37°C で 7 時間培養した後、終濃度 0.5 mM となるよう過酸化水素を添加してさらに 1 時間培養した。OD₆₆₀ = 1 の培養液 1 ml 分となるように菌体量を合わせて集菌した。菌体を 50 mM リン酸バッファー (pH 6.8) で 2 回洗浄後、同バッファー 0.1 ml に懸濁した。懸濁液 0.1 ml と、終濃度 100 μM となるよう 90% 容量で調製した過酸化水素溶液 0.9 ml を混合した。37°C で 1 時間インキュベート後、遠心分離して菌体を除いた上清に残存している過酸化水素を BIOXYTECH H₂O₂-560 (OXIS International) を用いて測定した。560 nm の吸光度は 2030 ARVO X Multilabel Reader (PerkinElmer) を用いて測定した。

4.2.11 *hprA1* 遺伝子のクローニングと組換え HprA1 タンパク質の調製

L. casei シロタ株の *hprA1* 遺伝子を、鋳型としたゲノム DNA、プライマー、および KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて PCR で増幅した。プライマーは、*Nde* I サイトまたは *Eco*R I サイトを付加して設計した (Table 4-2)。増幅した *hprA1* 遺伝子断片およびプラスミド pET-28b(+) を *Nde* I、*Eco*R I の制限酵素で切断後、ライゲーションし、このライゲーション反応液を *E. coli* JM109 に導入し形質転換した。得られたプラスミド pET-28b(+)-*hprA1* を pET system manual (Merck) に従って、*E. coli* BL21(DE3) に導入した。

His タグを付加した HprA1 タンパク質の発現は pET System Manual (Merck) に少し修正を加えて行った。pET-28b(+)-*hprA1* を内部に持つ *E. coli* BL21(DE3) を、カナマイシン 30 μg/ml を添加した 3 ml の LB 培地を用いて、37°C にて 160 rpm の速度で振とう培養し、OD₆₀₀ が 0.6 に達したところで培養液を 4°C で保存した。カナマイシンを含む新しい 200 ml の LB 培地に 3 ml の培養液を接種し、OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで 37°C で振とう培養した。終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 3 時間振とう培養し、目的タンパク質を発現させた。培養液を氷中に 5 分間置いた後、4°C、5,000 × g で 5 分間遠心分離して集菌した。培養液体積の 0.25 倍量の冷却した 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄し、遠心操作により集菌し、精製を開始するまで -80°C で凍結保存した。

cell lysate の調製は BugBuster Protein Extraction Reagent (Merck) を用い、添付のプロトコールに従って行った。His タグを付加した HprA1 タンパク質の精製は、Ni-NTA Fast Start Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従って行った。精製の各ステップで 5 μl ずつサ

ンプリングを行い、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gels (Life Technologies) を用いた SDS-PAGE に供し、精製 HprA1 タンパク質の純度が 95% 以上であることを確認した (Fig. 4-1)。

4.2.12 鉄結合能の測定

アポ HprA1 タンパク質は、HprA1 (200 μ M) を、10 mM EDTA、2 mM DTT と混合し、37°C で 60 分間インキュベートして調製した。反応後の溶液を、PD-10 カラム (GE healthcare) を用いて精製し、EDTA と遊離した鉄イオンを除いた。アポ HprA1 タンパク質 (50 μ M) と $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (10、100、1000 μ M) を 2 mM DTT 存在下にて室温で 5 分間インキュベートした。PD-10 カラム (GE healthcare) にアプライし、遊離の鉄イオンを除いてタンパク質画分を精製した。タンパク質画分の鉄濃度は、ICP 発光分光分析装置 (Vista-Pro; Agilent) を用いて測定した。

4.2.13 ヒドロキシルラジカル生成と検出

ヒドロキシルラジカルの生成と検出は、Halliwell[78]および Yamamoto[14]が報告している方法に従って行った。2 価鉄によって非酵素的にヒドロキシルラジカルを生成させ、このヒドロキシルラジカルによってデオキシリボースを分解し産生させたマロニルジアルデヒド様物質を、チオバルビツール酸と反応させることで、赤色物質を生成させた。この赤色物質の蛍光量をヒドロキシルラジカル生成量の指標として使用した。

具体的には下記の通り実施した。0.3 ml の basal reaction mixture (10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)、63 mM NaCl、4 mM 2-deoxyribose) にサンプルを添加し、終濃度 10 μ M となるよう $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を加え、total 2 ml で 37°C、15 分間インキュベートした。加熱融解した 0.25 ml の 1% (w/v) thiobarbituric acid と 0.25 ml の 2.8% (w/v) trichloroacetic acid を加えた後、反応液を 10 分間煮沸し、急冷した。生成した赤色物質を、蛍光分光光度計 RF-5300PC (SHIMADZU) を用いて、532 nm で励起し、553 nm の蛍光を測定した。

4.3 結果

4.3.1 酸素または過酸化水素ストレスを与えた *L. casei* シロタ株のトランスクリプトーム

解析

マイクロアレイ解析を実施した結果、酸素ストレスに応答して 11 遺伝子が発現促進し、1 遺伝子が発現抑制した (Fig. 4-2a、Table 4-3、4-5)。発現促進した遺伝子の中で、NADH オキシダーゼをコードする遺伝子が最も強く発現促進し、NADH ペルオキシダーゼや機能未知の遺伝子がそれに次いで発現促進していた。一方、過酸化水素ストレスに応答して 57 遺伝子が発現促進し、59 遺伝子が発現抑制した (Fig. 4-2a、Table 4-4、4-6)。発現促進した遺伝子の中で、L-lactate oxidase、ヒートショックプロテイン、NADH オキシダーゼ、機能未知、および CysE や CysK 等のシステイン生合成関連タンパク質をコードする遺伝子らが含まれていた。

NADH ペルオキシダーゼ (*npx*)、protein-methionine-S-oxide reductase (*msrB*)、ヒートショックプロテイン (*hsp*)、および 2 つの機能未知タンパク質をコードする 5 つの遺伝子の発現は、酸素および過酸化水素の両ストレスで、誘導された (Fig. 4-2)。これらの遺伝子が酸化ストレス耐性に特に重要であると考え、これら 5 つの遺伝子発現を確認するため、定量的リアルタイム PCR を行った。*npx*、*msrB*、CDS1839、および CDS2657 (*hprA1*) の 4 つの遺伝子発現は、酸素および過酸化水素の両ストレスにより有意に増加していた (Fig. 4-2b)。CDS2657 (*hprA1*) の発現は過酸化水素によって特に著しく (44 倍) 誘導された。一方、*hsp* は過酸化水素ストレスにより発現促進したが、酸素によっては有意な発現の増加が認められなかった。従って、その後の解析からは、*hsp* は除いた。

4.3.2 酸素および過酸化ストレス耐性への発現促進遺伝子の関与

npx、*msrB*、CDS1839、および *hprA1* の 4 つの遺伝子の酸化ストレス耐性への関与を明らかにするため、それぞれの遺伝子破壊株を作製し、これら破壊株の増殖性における酸素または過酸化水素ストレスの影響を検討した。嫌気条件においては、これら遺伝子破壊株の増殖性はまったく変化しなかった (Fig. 4-3b)。一方、好気条件においては、MS102 (*npx* 破壊株) の増殖性は野生株と比較して、少し悪化した (Fig. 4-3a)。次に、過酸化水素処理後の生残率について測定した。野生株と同様に、0.5 mM の過酸化水素処理後の MS102、MS103 (*msrB* 破壊株)、および MS104 (CDS1839 破壊株) の生菌数は、僅かに減少した (Fig. 4-4)。一方、MS105 (*hprA1* 破壊株) は過酸化水素に対して高い感受性を示した。そして、MS124 (MS105

の *hprA1* 遺伝子相補株) の生残率は、ほぼ野生株と同等なレベルに回復した。これらの結果から、*hprA1* が過酸化水素耐性に関与していることが示された。従って、*hprA1* 遺伝子の機能を明らかにするため、さらなる実験を行った。

4.3.3 *hprA1* の過酸化水素消去活性への関与

菌体の過酸化水素消去活性を調べたところ、野生株は加えた過酸化水素の半分を分解していたが、MS102 は全く過酸化水素を分解できなかった。MS105 は野生株とほぼ同程度過酸化水素を分解することが可能であった (Fig. 4-5)。この結果から、NADH ペルオキシダーゼが過酸化水素の分解に関与し、HprA1 は関与しないことが示された。

4.3.4 HprA1 アミノ酸配列からの機能予測

Blast を用いて、HprA1 アミノ酸配列の相同性検索を行った。HprA1 は *Lactobacillus* 属に広く分布しており、特に *L. casei* 種において高い相同性が保存されていた。*Enterococcus* 属や *Pediococcus* 属らの細菌も HprA1 のホモログを持っていたが、その他の細菌ではこのホモログは見られなかった。また、*Lactobacillus* 属は2つの HprA1 のホモログを持っていた。系統樹解析の結果から、これらは2つの大きなグループに分類された (Fig. 4-6)。*L. casei* シロタ株の中では、HprA1 は CDS1839 と高い相同性を示した。Table 4-7 において、*L. casei* シロタ株の HprA1 と他の代表的な乳酸菌の相同配列とを比較した結果を示す。相同配列でヒットしたものは、ほぼすべてが機能未知のタンパク質であった。HprA1 の生理的な機能を推定するため、InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) を用いてモチーフ・ドメイン検索を行った。その結果、HprA1 は Fe-S cluster biogenesis family (IPR00361) を持つことが示された。

4.3.5 HprA1 タンパク質の鉄結合性

MS105 は上記に示したように、野生株と同等の過酸化水素の分解が可能である。このことから、*hprA1* が過酸化水素消去とは別の機構で過酸化水素耐性に寄与していることが示唆された。そこで、*hprA1* はフェントン反応により生成するヒドロキシルラジカルの毒性効果を妨げることに関与すると仮定した。まず初めに、大腸菌において、発現、精製した組換え

タンパク質であるアポ HprA1 の鉄結合活性を調べた。BSA を陰性対照、フェリチン (apo-ferritin from equine spleen) を陽性対照として使用した。BSA は鉄との結合性を示さなかった。一方、フェリチンは予想よりも低かったが鉄との結合性を示した。HprA1 においては、50 μM の組換えタンパク質と $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10、100、1000 μM) を DTT 存在下でインキュベートした。なお鉄を 1000 μM 添加したサンプルは反応液が赤褐色に変化したため、結果から除外した。HprA1 は鉄との結合性を示し、鉄を 100 μM 添加した時には、1 分子あたり約 2 原子の鉄イオンと結合した (Table 4-8)。鉄を取り込ませた HprA1 の吸収スペクトルを測定したところ、280 nm のピークの高まりと、315 nm のマイナーピークを確認した。鉄濃度を増加させるに連れて、これらのピークの吸光度の増加を認めたことから (Fig. 4-7)、HprA1 タンパク質は鉄と結合することが示唆された。

4.3.6 HprA1 タンパク質によるヒドロキシルラジカル生成の抑制

アポ HprA1 タンパク質が鉄との結合性を示したため、ヒドロキシルラジカル生成におけるアポ HprA1 タンパク質の抑制効果を調べた。個々のサンプルを添加したときのヒドロキシルラジカル生成量を測定し、結果は、ヒドロキシルラジカル生成阻害度として表した (Table 4-9)。BSA を陰性対照、フェリチンおよび鉄キレート剤であるデフェロキサミンを陽性対照として使用した。デフェロキサミンはヒドロキシルラジカル生成を濃度依存的に抑制し、100 μM 添加した場合 81.2% 生成を抑制した。対照的に、フェリチンはこの実験条件ではヒドロキシルラジカルの生成を抑制しなかった。HprA1 のアポタンパク質は、デフェロキサミンと同様に濃度依存的にヒドロキシルラジカル生成を抑制し、10 μM 添加した場合 42.4% を抑制した (Table 4-9)。

4.4 考察

L. casei シロタ株の酸化ストレス耐性に関与する遺伝子を調べるため、酸素または過酸化水素ストレス条件下でマイクロアレイ解析を行った。過酸化水素処理により発現促進した遺伝子数は、酸素処理により発現促進した遺伝子数よりも多かった。また、発現促進遺伝子は、NADH オキシダーゼ (CDS0252)、NADH ペルオキシダーゼ (CDS0427)、molecular

chaperone HSP18 (CDS0686、CDS2656)、GroEL (CDS2119)、および protein-methionine-S-oxide reductase (CDS1501) 等の酸化ストレス耐性遺伝子を含んでいた。チオレドキシソキシソレダクターゼシステムは、好氣的条件または過酸化水素によって、誘導されることが報告されている[64, 70]。しかし、過酸化水素ストレスにより 4 つのチオレドキシソのうち 1 つのみが (CDS0780 ; *trxA1*) 僅かな発現促進が見られたが、それ以外のチオレドキシソとチオレドキシソレダクターゼは、酸素または過酸化水素ストレスの条件下で発現量に変化は認められなかった。これらの結果は、第 2 章の結果と類似しており、チオレドキシソ-チオレドキシソレダクターゼシステムの構成的な発現が、*L. casei* の酸素および過酸化水素耐性において重要な役割を果たしていることを示唆している。一方、発現抑制遺伝子において、どのように過酸化水素耐性に関与しているのかは明らかではない。推測ではあるが、ストレスの負荷がかかった場合、遺伝子発現がそのストレス回避に必要なものにシフトすると考えられ、緊急性のない遺伝子は発現量が減少するのかもしれない。

過酸化水素は NADH ペルオキシダーゼによって分解されること[4]、また、一部の *L. plantarum* の株はマンガンカタラーゼを生成し[13]、それによっても過酸化水素が分解されることはよく知られている。本研究において、*npx* 破壊株である MS102 はその活性を消失した。一方、*hprA1* 破壊株の MS105 の過酸化水素分解活性は、野生株よりも僅かに低かったが、ほぼ同等であった。この野生株との僅かな違いは、活性の差というよりもむしろ測定時の生菌数の差により生じたと考えている。その理由は以下の通りである。*L. casei* シロタ株の過酸化水素分解活性は過酸化水素の前処理無しで検出できないため、過酸化水素の前処理は必要な手順である。しかし、この前処理がおそらく *hprA1* 破壊株にダメージを与え、Fig. 4-4 に示すように、生菌数を低下させている。つまり、過酸化水素消去活性の試験において、前処理による菌の死滅のため、僅かな過酸化水素消去活性の差が見られたと考えている。さらに、*npx* 破壊株 (MS102) はまったく過酸化水素を分解することができなかった。従って、*L. casei* シロタ株の過酸化水素分解活性の大部分は NADH ペルオキシダーゼが担っており、このことから、*HprA1* は過酸化水素活性を持たないと考えられた。そこで、*HprA1* は過酸化水素消去とは異なったメカニズムで過酸化水素耐性を持つと考えた。*HprA1* の生理的な機能を推測するために、InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) を用いてモチーフ・ドメイン検索を行った。*HprA1* は Fe-S cluster biogenesis family

(IPR00361) に属しており、このファミリーは *IscA* や *HesB* を含んでいることがわかった。シアノバクテリアにおいて、*hesB* はその機能が完全に理解されていないが、窒素固定条件でのみ発現している[79]。*iscA* は、大腸菌 Fe-S クラスター合成遺伝子群 ISC マシーナリーの一つで、オペロン構造を持つことが報告されている [80, 81]。その遺伝子群の中で、*IscA* の機能についての情報は乏しいが、*IscA* が鉄結合タンパク質であることを示し、Fe-S クラスター合成において鉄を供給する機能を推定する報告もある[82, 83]。2 価の鉄イオンと過酸化水素は、フェントン反応と呼ばれる反応によって毒性の高いヒドロキシルラジカルを発生することが知られている。*Streptococcus mutans* の鉄結合タンパク質である *Dpr* は、*in vitro* において鉄依存的なヒドロキシルラジカル生成を抑制する[14]。これらから、*hprA1* の機能は 2 価の鉄イオンと結合し、それによって鉄依存的なヒドロキシルラジカル生成を抑制する仮説を導いた。

本研究の結果、100 μ M の鉄との反応により、*HprA1* タンパク質 1 分子あたり約 2 原子の鉄との結合が認められた (Table 4-8)、そしてヒドロキシルラジカルの生成を *HprA1* の濃度依存的に抑制した (Table 4-9)。しかし、*L. casei* シロタ株の *HprA1* は、*S. mutans* の *Dpr* と相同性はなくホモログではないと考えられた (結果は示さず)。*Dpr* 複合体は、最大 480 個の鉄原子と結合しており[14]、その機能性は異なるが、フェントン反応を抑制する点で、両者は共通の過酸化水素耐性メカニズムを持つことが示唆された。

本研究で陽性対照としたフェリチンは、鉄結合性や、ヒドロキシルラジカル生成抑制活性が高くなかった (Table 4-8、4-9)。Yamamoto らの報告の中でも、フェリチンはヒドロキシルラジカルの生成をかなり抑制していた[14]。その報告のなかで、フェリチン 1000 nM 添加によるヒドロキシルラジカル生成阻害は 12.3%とそれほど高くなく、その原因としてこのアッセイ系では鉄によるヒドロキシルラジカル生成と、試験サンプルによる鉄のキレートとの競合が起こっているが、フェリチンは鉄との親和性が低いために、ヒドロキシルラジカル生成反応を阻害するのに十分でなかったと考察されている[14]。また、別の報告では、酵母で単独で発現させたヒトフェリチンはほとんど鉄を含んでおらず、鉄シャペロンの存在によってフェリチンを満たす鉄の量が増加する[84]。これらの理由から、本研究においても、フェリチンは高い鉄結合性を示さなかったと考えられた。

Fe-S タンパク質は細菌から哺乳類まで幅広く分布しており、おもに電子伝達に関与して

いる。乳酸菌における Fe-S クラスターの合成の詳細はほとんどわかっていない。*hprA1* の破壊株の増殖性が酸素ストレスによって影響を受けなかったことから、HprA1 は Fe-S クラスター合成には関与していないと推察しているが、この問題についてはさらなる検討が必要であると考えている。

ところで、CDS1839 は、酸素および過酸化水素の両ストレスによって発現促進していたが、HprA1 のアミノ酸配列と 42.6% と高い相同性を示し (Table 4-7)、酸化ストレスの防御において何らかの共通した機能を持つことが予想された。しかし、CDS1839 の組換えタンパク質を十分に発現させることができなかつたため、その性質を調べることができなかつた。CDS1839 破壊株である MS104 は、酸化ストレス条件下で、野生株と違いが見られず HprA1 破壊株である MS105 と挙動が異なつた。この違いが CDS1839 と *hprA1* の、量的な違いによるものなのか、それとも質的な違いによるものなのか、現時点では全く不明であるが、CDS1839 の機能についても非常に興味を持たれる。

以上をまとめると、*L. casei* シロタ株の HprA1 タンパク質は、細胞内の鉄と結合し、フェントン反応を抑えることで過酸化水素耐性に寄与することが示唆された。*hprA1* は *Lactobacillus* 属に一般に分布している。本研究では、過酸化水素を人工的に添加したが、自然好気環境においては、酸素代謝の過程で過酸化水素が発生していると考えられる。また、ヒドロキシルラジカルも、細胞内の微量な鉄と過酸化水素が反応し、発生していると考えられる。好氣的条件で良好に生育する *Lactobacillus* 属において、*hprA1* の発現は、ヒドロキシルラジカルの高い毒性を回避する合理的なメカニズムであると考えられる。

Table 4-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or phenotype	Source or reference
Strains		
<i>L. casei</i>		
Shirota (YIT 9029)	Wild-type	Our collection
MS102	<i>npx</i> ::pYSSE3- Δ <i>npx</i> , Em ^r	This study
MS103	<i>msrB</i> ::pYSSE3- Δ <i>msrB</i> , Em ^r	This study
MS104	<i>CDS1839</i> ::pYSSE3- Δ <i>CDS1839</i> , Em ^r	This study
MS105	<i>hprA1</i> ::pYSSE3- Δ <i>hprA1</i> , Em ^r	This study
MS124	MS105 <i>attB</i> ::pYAP310- <i>hprA1</i> , Em ^r Cm ^r	This study
<i>E. coli</i>		
JM109	Commercial strain purchased from Toyobo Co., Ltd.	
BL21(DE3)	Commercial strain purchased from Merck Ltd.	
Plasmids		
pET-28b(+)	Commercial plasmid purchased from Merck Ltd.	
pET-28b(+)- <i>hprA1</i>	pET-28b(+) carrying wild-type <i>hprA1</i>	This study
pYSSE3	<i>E. coli</i> cloning vector carrying pUC19 <i>ori</i> region, pAM β 1 erythromycin resistance gene and multicloning sites	Yasuda <i>et. al.</i> (2008)
pYSSE3- Δ <i>npx</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>npx</i>	This study
pYSSE3- Δ <i>msrB</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>msrB</i>	This study
pYSSE3- Δ <i>CDS1839</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>CDS1839</i>	This study
pYSSE3- Δ <i>hprA1</i>	pYSSE3 carrying truncated fragment of <i>hprA1</i>	This study
pYAP310	<i>E. coli</i> cloning vector carrying p15A <i>ori</i> region, pC194 chloramphenicol resistance gene, phiFSW <i>attP</i> site and <i>int</i> , multicloning site and synthetic promoter sequence active in lactobacilli upstream of the multicloning site	This study
pYAP310- <i>hprA1</i>	pYAP310 carrying wild-type <i>hprA1</i>	This study

Table 4-2. Primers used in this study

Target gene	Primer sequence (5'→3')		Restriction enzyme site
	Forward	Reverse	
Construction of insertion mutants			
<i>npx</i>	TGCTCTAGAAATTAATTCTGAGTTCAGG	AAACTGCAAGGAAAACGCTCAACGCACTG	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
<i>msrB</i>	CGCGGATCCGTTTACTGGCGAGTACGACG	AAACTGCAGTTTTGCAAGCTGGACCGTCTG	<i>Bam</i> H I/ <i>Pst</i> I
<i>CDS1839</i>	CGCGGATCCGTTTACTGGCGAGTACGACG	CCCAAGCTTCATCCTTAATGCTGATCCG	<i>Bam</i> H I/ <i>Hin</i> d III
<i>hprA1</i>	CGCGGATCCGTTTCTGTGCCATTGGAAA	AAACTGCAGTGTATCAACGAGGCCAAC	<i>Bam</i> H I/ <i>Pst</i> I
Confirmation of insertion mutants			
<i>npx</i>	TTAAGTTGGGTAACGCCAGG	ATGTAGAGTTCCTTGTGAT	
<i>msrB</i>	TTAAGTTGGGTAACGCCAGG	GGTCTGTATTGCTACCATG	
<i>CDS1839</i>	TTAAGTTGGGTAACGCCAGG	CATCAGCAACACAAAAAGTG	
<i>hprA1</i>	TTAAGTTGGGTAACGCCAGG	AAACTGCAGCCATAGCTGCGTTCTGACAT	
Construction of vector for complementation test			
<i>cat</i>	GAAAGATCTGAAAATTGGATAAAGTGGGA	TAAATGCGCAAACCTTCTCAACTAACGG	<i>Bgl</i> II/ <i>Fsp</i> I
Complementation test			
<i>hprA1</i>	TCCCCCGGGGTGCACAACCTCAATAGAGAG	AAACTGCAGTTAGCAAATTTTGCCGCCCA	<i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I
Protein preparation			
<i>hprA1</i>	GGAAATCCATATGCAAAATCTCAATCAAACC	CGGAATTCTTAGCAAATTTTGCCGCCCA	<i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> R I
qRT-PCR			
<i>npx</i>	CGGCAATCAATGCTGATGIG	CTGCGTCGTGCCGTTCT	
<i>msrB</i>	TCACCAAGCCAATCAGCAAA	AACACGTTCCATGCCAAAAC	
<i>CDS1839</i>	TGATGCTCAGCTTATTTGGAT	GCCAAACACATCTGCACCAT	
<i>hsp</i>	CGACAAGGACGGCAATATGTT	TGACATTTGGCAGCCGATAA	
<i>hprA1</i>	GCGCTGCCACTGGACAAC	CAGACCACTGCCGAAATAATCC	
16S rRNA	CGTTCCTCCGGCCTTGATC	CGGCTTCGGGTGTACAAA	

The restriction enzyme sites are indicated (underlined).

Table 4-3. Genes up-regulated in oxygen stress

Gene ID	Product	Fold change
CDS0252	NADH oxidase	14.2
CDS0427	NADH peroxidase	6.6
CDS0581	H ⁺ -symporter	3.0
CDS0820	putative transcriptional regulator /DNA-directed RNA polymerase, sigma factor 30	3.3
CDS1213	dipeptide ABC transporter (dipeptide binding protein)	2.4
CDS1499	endonuclease IV	4.2
CDS1500	conserved hypothetical protein	2.3
CDS1501	protein-methionine-S-oxide reductase	4.2
CDS1839	hypothetical protein	5.4
CDS2656	heat shock protein hsp18	2.6
CDS2657	hypothetical protein	10.0

Table 4-4. Genes up-regulated in hydrogen peroxide stress

Gene ID	Product	Fold change
CDS0140	no hit	3.6
CDS0155	hypothetical protein	7.3
CDS0427	NADH peroxidase	3.9
CDS0448	dihydroxy acetone kinase	2.3
CDS0449	dihydroxy acetone kinase / glycerone kinase	3.0
CDS0499	homoserine O-succinyltransferase	5.2
CDS0500	cystein synthetase A	5.0
CDS0566	calcium transporting P-type ATPase	4.2
CDS0630	stress-induced protein / hydroperoxide resistance	3.4
CDS0647	iron dependent peroxidase	2.4
CDS0676	hypothetical protein	2.5
CDS0678	tagatose-1,6-diphosphate aldolase	3.3
CDS0679	galactose-6-phosphate isomerase subunitB	3.3
CDS0680	galactose-6-phosphate isomerase subunitA	2.5
CDS0686	molecular chaperone (small heat shock protein), HSP18	5.1
CDS0709	B. subtilis YqkB protein homolog	33.0
CDS0740	oligo endopeptidase F	2.5
CDS0780	thioredoxin	2.4
CDS0894	conserved hypothetical protein	9.2
CDS1077	acyl-CoA thioesterase family protein/arylesterase	4.7
CDS1323	phosphopantetheine adenyltransferase	2.7
CDS1447	formyltetrahydrofolate synthetase	2.9
CDS1501	protein-methionine-S-oxide reductase	5.4
CDS1656	ABC transporter (binding protein)	10.4
CDS1657	hypothetical protein	14.4
CDS1698	hypothetical protein	2.5
CDS1721	ATP dependent Clp protease	4.1
CDS1774	putative phosphoenolpyruvate carboxykinase	2.5
CDS1779	cell surface protein precursor, GY family	2.7
CDS1785	alpha-acetolactate decarboxylase protein	4.0
CDS1786	alpha-acetolactate synthase (pH6) large subunit	3.1
CDS1829	oligopeptide ABC transporter (ATP binding protein)	9.0
CDS1830	no hit	13.7
CDS1831	oligopeptide ABC transporter permease	14.1
CDS1832	oligopeptide ABC transporter permease	11.2
CDS1833	oligopeptide ABC transporter substrate binding protein	35.3
CDS1839	hypothetical protein	5.5
CDS1872	GMP synthase	3.6
CDS1914	thiamine biosynthesis lipoprotein	3.3
CDS1917	starch (bacterial glycogen) synthetase	2.6
CDS2088	cytochrome D ubiquinol oxidase (subunit I)	2.7
CDS2098	ygaP iron-sulfur-binding protein	3.2
CDS2108	no hit	3.1
CDS2119	class I heat shock protein / 60KD chaperonin GroEL	2.4
CDS2146	partially phospholipase C	3.0
CDS2219	L-lactate oxidase	26.2
CDS2284	NADPH flavin reductase	2.6
CDS2350	probable membrane protein	2.8
CDS2361	putative transcriptional regulator of class III stress genes (CtsR) homolog	2.5
CDS2446	oxidoreductase	2.9
CDS2630	PTS system, fructose-specific IIC component	5.3
CDS2656	heat shock protein hsp18	3.5
CDS2657	hypothetical protein	10.0
CDS2683	PTS system fructose specific enzyme IID component	2.4
CDSP060	cysE serine acetyltransferase	20.7
CDSP061	metB methionine biosynthesis	16.3
CDSP062	cysK O-acetylserine sulfhydrylase	18.1

Table 4-5. Genes down-regulated in oxygen stress

Gene ID	Product	Fold change
CDS1447	formyltetrahydrofolate synthetase	0.356

Table 4-6. Genes down-regulated in hydrogen peroxide stress

Gene ID	Product	Fold change
CDS0060	hypothetical protein	0.484
CDS0081	weakly related to PemK-like cell growth regulatory protein ChpA(E.coli)	0.460
CDS0150	dipeptide ABC transporter (dipeptide binding protein)	0.107
CDS0211	rhamnosyltransferase	0.466
CDS0224	membrane bound protein / transcriptional regulator	0.347
CDS0279	dipeptide ABC transporter (dipeptide-binding protein)	0.093
CDS0329	hypothetical cytosolic protein	0.446
CDS0650	probable transport protein	0.264
CDS0765	preprotein translocase	0.353
CDS0767	metalloregulatory protein	0.377
CDS0783	D-alanyl transfer protein dltB /peptidoglycan biosynthesis protein	0.285
CDS0784	D-Ala carrier protein	0.275
CDS0833	transcriptional regulator (MerR family)	0.400
CDS1097	hypothetical protein	0.455
CDS1131	cold shock protein	0.361
CDS1211	deoxyguanosine kinase	0.460
CDS1297	hypothetical protein	0.476
CDS1311	cation transporting P-type ATPase homolog	0.382
CDS1328	ribosomal protein S15	0.422
CDS1436	orotate phosphoribosyltransferase	0.047
CDS1437	orotidine phosphate decarboxylase	0.050
CDS1438	dihydroorotate dehydrogenase B	0.072
CDS1439	carbamoyl phosphate synthetase (catalitic subunit)	0.073
CDS1440	carbamoyl phosphate synthetase (glutaminase subunit)	0.105
CDS1441	dihydroorotase	0.098
CDS1442	aspartate carbamoyltransferase	0.110
CDS1443	uracil permease	0.095
CDS1444	pyrimidine operon regulator	0.045
CDS1558	ribosomal protein S2	0.372
CDS1565	conserved hypothetical protein	0.377
CDS1566	ribosomal protein L19	0.224
CDS1611	ribosomal protein L21	0.350
CDS1660	ribosomal protein L20 (50S)	0.296
CDS1661	initiation factor IF-3	0.303
CDS1679	hypothetical methyltransferase	0.352
CDS1691	arginyl tRNA synthase	0.415
CDS1729	conserved hypothetical protein	0.433
CDS1750	weakly probable acetyltransferase	0.353
CDS1751	conserved hypothetical protein	0.261
CDS1768	ABC transporter (ATP binding protein)	0.367
CDS1781	seryl tRNA synthetase	0.405
CDS1791	ribosomal protein L33	0.362
CDS1864	Lactobacillus sakei PepR protein / prolyl aminopeptidase	0.133
CDS1865	dipeptide transport protein	0.208
CDS1866	endo-1,4-beta glucanase /glutamyl aminopeptidase	0.222
CDS1867	oligopeptide ABC transporter (binding protein)	0.193
CDS1890	glucosyl transferase	0.268
CDS1953	oligopeptide ABC transporter (ATP binding protein)	0.119
CDS1954	oligopeptide ABC transporter (ATP binding protein)	0.154
CDS1955	oligopeptide ABC transporter (permease)	0.294
CDS1956	oligopeptide ABC transporter (permease)	0.291
CDS1957	dipeptide ABC transporter (dipeptide binding protein)	0.235
CDS2009	transcriptional regulator (MarR family)	0.391
CDS2010	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase 1	0.416
CDS2323	ribosomal protein L17	0.461
CDS2349	ribosomal protein S10 (BS13)	0.441
CDS2353	elongation factor G	0.377
CDS2714	hypothetical protein	0.351
CDS2760	ribonuclease P protein component	0.431

Table 4-7. Comparison of the amino acid sequence of *L. casei* strain Shirota HprA1 to those of other lactic acid bacteria

Strain	Accession No.	Product	Score	Coverage (%)	E-value	Identity (%)
<i>L. casei</i> strain Shirota	(HprA1)	Hydrogen peroxide resistant protein	270	100	4E-97	100
	(CDS1839)	hypothetical protein	85.5	75	7E-25	42.6
<i>L. casei</i> BL23	YP_001988915	hypothetical protein	270	100	4E-97	100
	YP_001988045	hypothetical protein	85.5	75	7E-25	42.6
<i>L. casei</i> ATCC334	YP_807957	hypothetical protein	270	100	4E-97	100
	YP_807099	hypothetical protein	82.8	75	6E-24	41.6
<i>L. rhamnosus</i> GG	YP_003172551	hypothetical protein	224	100	4E-79	80.6
	YP_003171695	hypothetical protein	85.5	73	6E-25	43.4
<i>L. plantarum</i> WCFS1	NP_785627	hypothetical protein	122	100	5E-39	45.6
	NP_786379	hypothetical protein	71.6	71	9E-20	34.7
<i>L. brevis</i> ATCC367	YP_794583	hypothetical protein	119	100	4E-38	47.0
	YP_795855	hypothetical protein	82.8	84	6E-24	38.9
<i>L. acidophilus</i> NCFM	YP_193032	hypothetical protein	102	87	2E-31	44.4
	YP_193402	hypothetical protein	79.3	86	1E-22	37.4
<i>L. johnsonii</i> NCC533	NP_964095	hypothetical protein	94.4	100	3E-28	37.3
	NP_965826	hypothetical protein	79	87	2E-22	36.1
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	ABJ67421	hypothetical protein	121	100	8E-39	50.7
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6055	EOK07951	hypothetical protein	73.9	84	9E-21	34.2

Table 4-8. Iron-binding capacity of HprA1

	Protein conc. (μM)	Iron conc. (μM)	Iron conc. of iron-loaded protein solution (mg/kg)	Iron atoms /molecule or subunit
HprA1	50	10	0.29	0.31
		100	1.70	1.83
BSA	50	10	<0.1	-
		100	<0.1	-
Ferritin (subunit)	50	10	<0.1	-
		100	0.27	0.29

Data are means of two independent experiments.

Table 4-9. Effect of HprA1 on hydroxyl radical formation

Sample	Conc. (μM)	Extent of hydroxyl radical formation (arbitrary units)			Inhibition (%)		
No addition		310.2	\pm	3.7			
HprA1	0.1	329.2	\pm	0.4	<0		
	1	246.2	\pm	16.2	20.6	\pm	5.2
	10	178.8	\pm	2.2	42.4	\pm	0.7
BSA	1	326.1	\pm	4.9	<0		
	10	863.9	\pm	22.2	<0		
Ferritin	0.1	321.5	\pm	1.6	<0		
	1	306.3	\pm	11.1	1.3	\pm	3.6
	10	387.8	\pm	9.2	<0		
Deferoxamine	1	309.4	\pm	7.4	0.3	\pm	2.4
	10	237.5	\pm	4.4	23.4	\pm	1.4
	100	58.3	\pm	2.6	81.2	\pm	0.8

Data are means \pm standard deviations of triplicates.

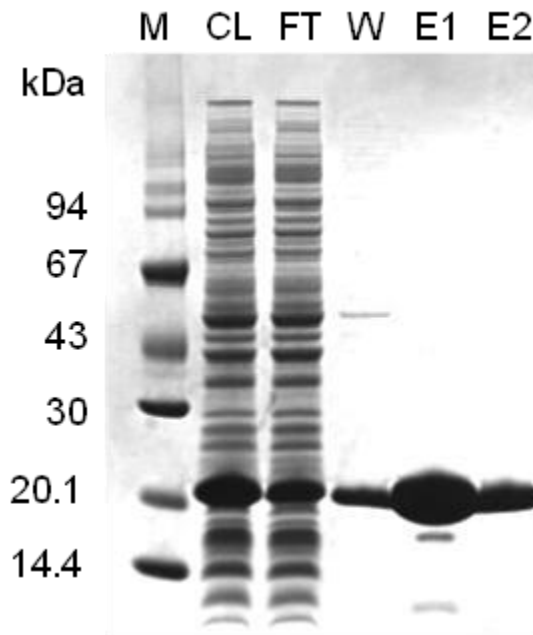


Fig. 4-1. Preparation of HprA1 protein. Five microliters of each fraction was loaded on to the gel. A mixture of E1 and E2 fraction was used for the experiments. M, protein marker; CL, cell lysate; FT, flow-through fraction; W, wash fraction; E1 and E2, elution fractions.

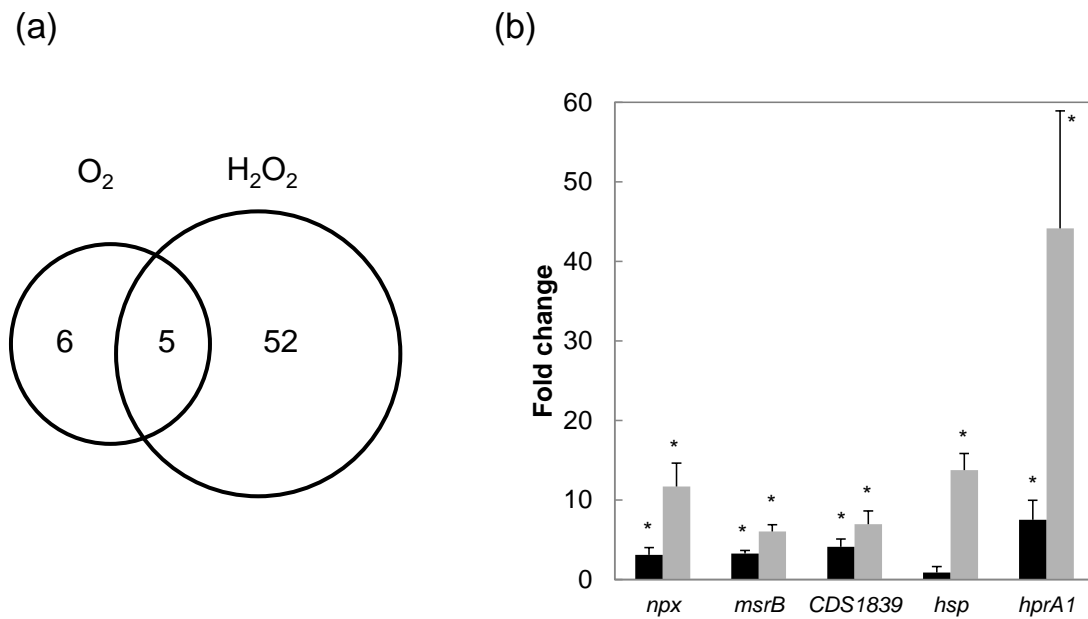


Fig. 4-2. Genes up-regulated under oxidative stress. (a) Venn diagram representing the number of genes that were up-regulated by oxygen and hydrogen peroxide stress on microarray analysis. (b) Quantitative real-time PCR analysis to confirm five genes up-regulated by both stressors. *npx*, NADH peroxidase (CDS0427); *msrB*, protein-methionine-S-oxide reductase (CDS1501); *hsp*, heat shock protein (CDS2656); *hprA1*, hypothetical protein (CDS2657). Black bars represent expression under exposure to oxygen relative to that under anaerobic conditions, and grey bars represent expression under exposure to hydrogen peroxide relative to that under static aerobic conditions. Results are shown as fold changes compared to each control condition. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. Significant differences compared to unstressed control are indicated by an asterisk ($P < 0.05$).

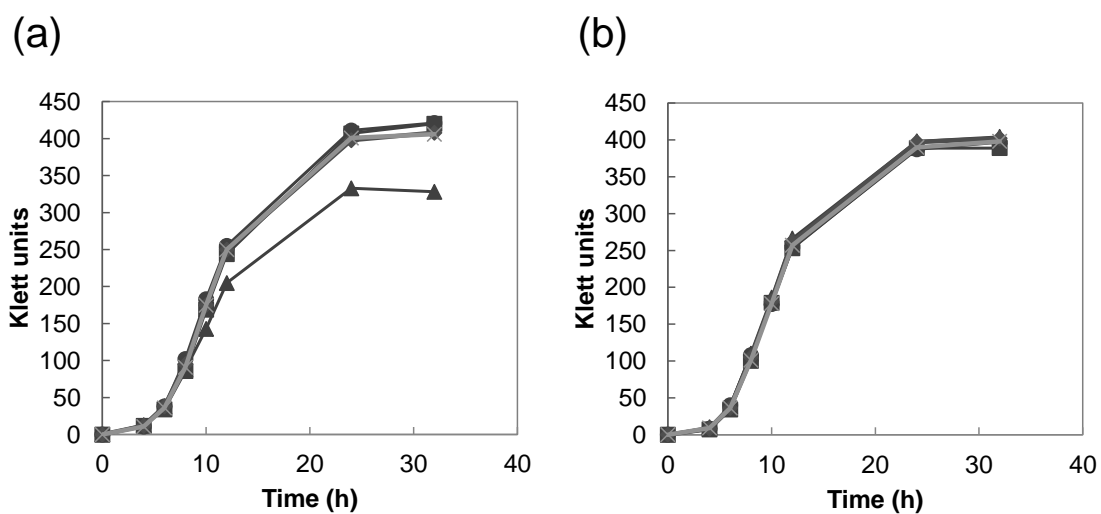


Fig. 4-3. Growth of *L. casei* strain Shirota and gene disruption mutants under (a) aerobic and (b) anaerobic conditions. Overnight MRS cultures were inoculated into fresh MRS cultures. ●, wild-type strain; ▲, MS102 (*npx* mutant); ■, MS103 (*msrB* mutant); ◆, MS104 (CDS1839 mutant); and ×, MS105 (*hprA1* mutant). Data are representative of two independent experiments.

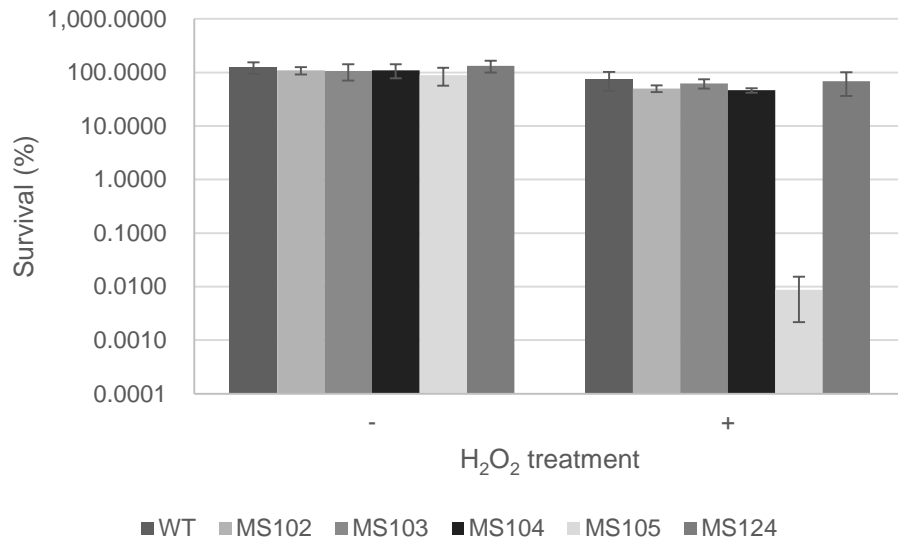


Fig. 4-4. Survival of *L. casei* strain Shirota and mutants upon addition of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide (0.5 mM) and cells were incubated in potassium phosphate buffer (pH 6.8) at 37°C for 3 h. The numbers of viable cells were counted at 0 and 3 h, and survival rates were measured. WT, wild-type; MS102, *npx* mutant; MS103, *msrB* mutant; MS104, CDS1839 mutant; MS105, *hprA1* mutant; MS124, complement of *hprA1* mutant. Data are means of triplicates. Error bars indicate standard deviations.

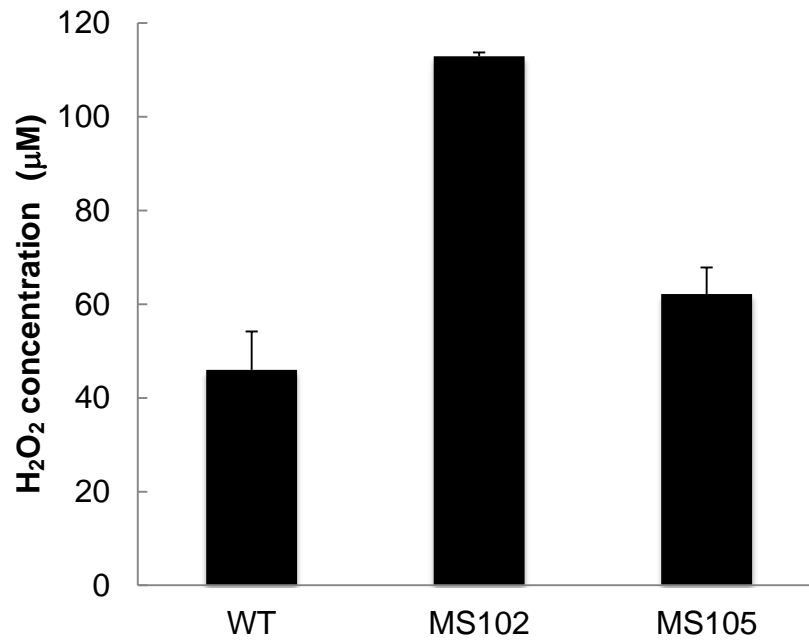


Fig. 4-5. Decomposition of hydrogen peroxide by *L. casei* strain Shirota and gene disruption mutants. Hydrogen peroxide (100 µM) and cells were incubated at 37°C for 1 h and the concentrations of hydrogen peroxide remaining were then measured. WT, wild-type; MS102, *npx* mutant; MS105, *hprA1* mutant. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

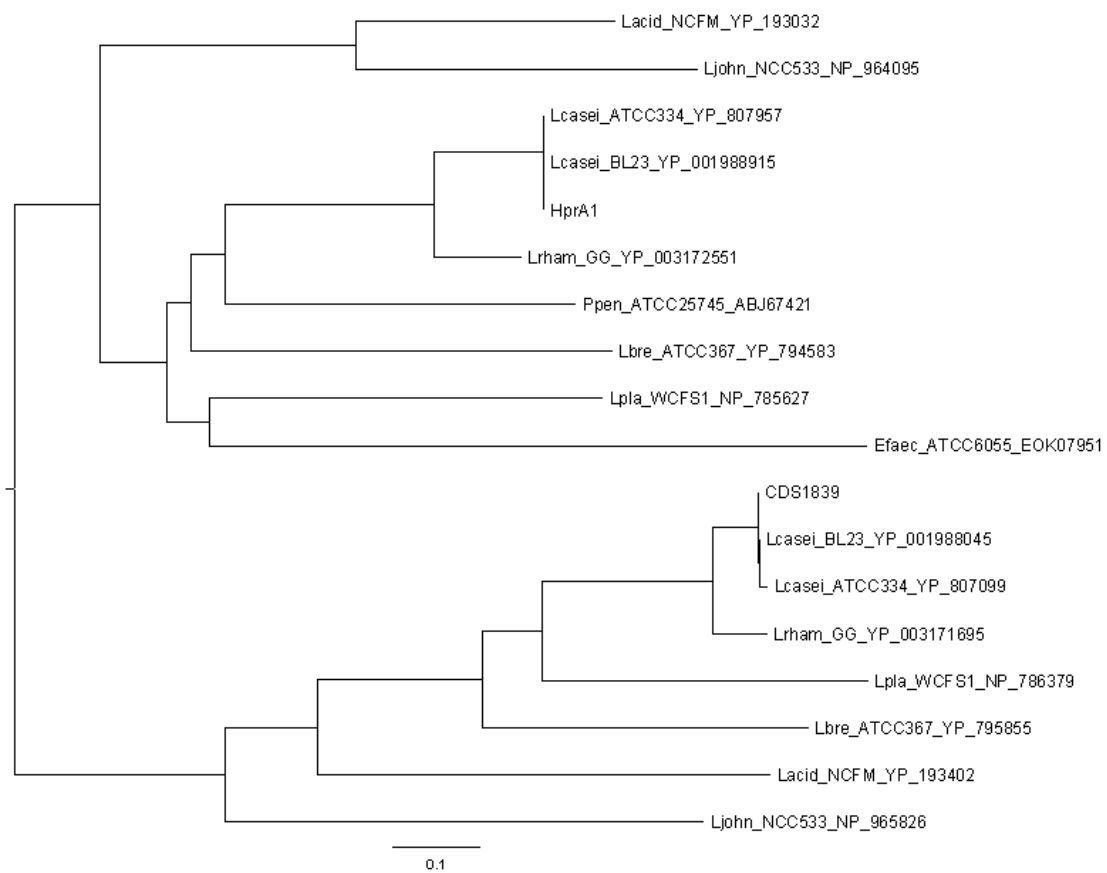


Fig. 4-6. Phylogenetic tree showing the relationship of HprA1 protein with homologous proteins.

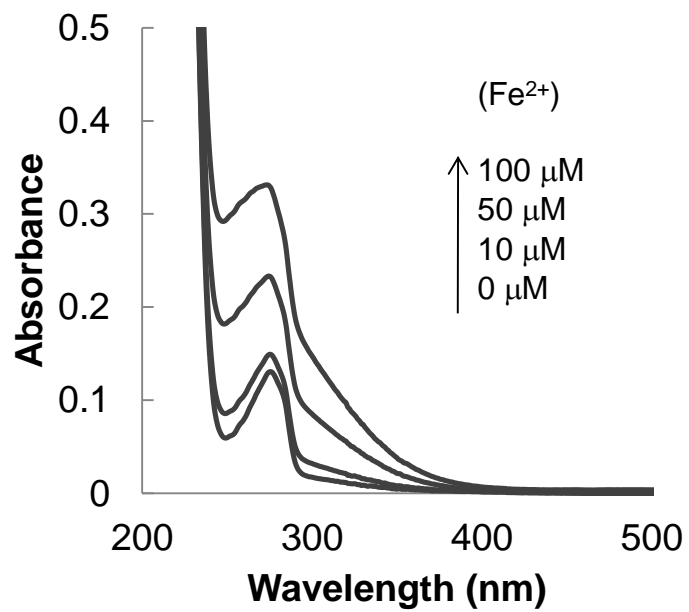


Fig. 4-7. UV-visible absorption spectra of HprA1 after incubation with iron at different concentrations.

第5章 総括

好気性生物は、酸素および酸素に由来する種々の活性酸素種の毒性を回避する様々なメカニズムを保有している。通性嫌気性菌である乳酸菌もまた、酸素存在下で生育が可能で、いくつかの関与因子が報告されているが、種によって独自の機構を持つことが知られている。*Lactobacillus casei* シロタ株は発酵乳の製造に使用されている菌株であり、その製造、流通過程では好気的な環境にさらされているが、製品中での高い菌数を維持している。そこで、*Lactobacillus casei* シロタ株が持つ酸化ストレス耐性に関与する遺伝子を同定し、その耐性機構を明らかにすることを目的として検討を進めた。

第2章では、*Lactobacillus casei* シロタ株のスーパーオキシド耐性におけるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) とマンガンの影響、およびマンガン輸送システムの解析を行った。*L. casei* は高濃度のマンガンが菌体内に蓄積し、マンガンが好気的な生育中に発生するスーパーオキシドの除去を担っているとされていた。しかし近年、*L. casei* において SOD 遺伝子をコードし、それらが発現しているとの相反する結果が報告された。そこで、*L. casei* シロタ株のゲノムを調べたところ、SOD 遺伝子 (*sodA*) もまたコードしていた。そこで、SOD とマンガンのいずれか、もしくは両者が *L. casei* シロタ株の好気的な生育に貢献していると予測し、*L. casei* シロタ株がどのようにスーパーオキシドの毒性を消去しているかを明らかにしようとした。*L. casei* シロタ株の *sodA* をクローニングし、大腸菌と *L. casei* シロタ株で発現させたが、SOD 活性は上昇しなかった。このことから、*L. casei* シロタ株の SOD タンパク質は不活性型であり、菌体内で機能していないことが示唆された。次に *L. casei* シロタ株におけるマンガントランスポーターの役割に着目した。*L. casei* シロタ株のゲノムには1つの ABC 型マンガントランスポーター (*mtsCBA*) と3つの NRAMP 型マンガントランスポーター (*mntH1*、*mntH2*、*mntH3*) が存在した。これらの遺伝子の役割を明らかにするために、単独もしくは複数のマンガントランスポーターをいくつかの組み合わせで破壊し、細胞内のマンガン濃度を測定した。その結果、*mntH1*、*mntH2* および ABC 型マンガントランスポーターにコードされる遺伝子が相補的に細胞内マンガン蓄積に関与していることを見出した。これらの結果から、SOD ではなく、複数の相補的に働くマンガントランスポーターによって細胞内に蓄積されたマンガンが *L. casei* シロタ株のスーパーオキシド耐性に非常に

重要な役割を持つことを示した (Fig. 5-1)。

第3章では、*Lactobacillus casei* シロタ株の酸化ストレス耐性におけるチオレドキシソとチオレドキシソレダクターゼの役割を調べた。*L. casei* シロタ株は、*trxA1*、*trxA2*、*trxA3*、*trxA4* と命名した4つのチオレドキシソと推定される遺伝子、および *trxB* と命名した一つのチオレドキシソレダクターゼと推定される遺伝子をゲノム上に保持していた。*trxA1*、*trxA2*、*trxB* をそれぞれ破壊した変異株、*trxA1* と *trxA2* の両者を破壊した変異株を作製し、増殖や、酸化ストレスに対する応答を調べた。好気条件下においては、*trxA1* 破壊株 (MS108) と *trxA2* 破壊株 (MS109) は僅かな生育阻害が見られ、*trxA1 trxA2* 二重破壊株 (MS110) は倍加時間の延長と最終到達濁度の低下に特徴づけられる重度の生育阻害が見られた。さらに、チオレドキシソレダクターゼを欠損した *trxB* 破壊株 (MS111) は、嫌気条件下では僅かに生育できたものの、好気条件下では生育不可能であった。遺伝子破壊株の生育阻害は、ジチオスレイトールや還元型グルタチオン等のチオール化合物の添加によりある程度回復した。それに加え、過酸化水素やジスルフィドストレスに対して、MS110、MS111 は野生株よりも強い感受性を示した。特に、MS111 のストレス感受性は顕著に増加した。一方、これらの遺伝子の転写は酸化ストレスによって僅かな影響しか受けなかった。以上の結果から、チオレドキシソ-チオレドキシソレダクターゼシステムはチオール/ジスルフィドの酸化還元状態を維持する主たるシステムであり、通性嫌気性菌である *L. casei* の好気条件下での生育に必須であることが示唆された (Fig. 5-1)。

第4章では、*Lactobacillus casei* シロタ株の新規過酸化水素耐性遺伝子の機能解析を行った。*L. casei* シロタ株における酸化ストレス耐性のメカニズムを明らかにするため、酸素または過酸化水素で処理したシロタ株のマイクロアレイ解析を実施した。酸素と過酸化水素の両ストレスで高発現した機能未知の遺伝子に着目した。この遺伝子を *hprA1* 遺伝子 (hydrogen peroxide resistance gene) と命名した。次に、酸化ストレス耐性における *hprA1* の関与および過酸化水素耐性のメカニズムを調べた。*hprA1* 破壊株である MS105 の生育は酸素ストレスによって影響されなかったが、過酸化水素処理後の MS105 の生存率は野生株と比較して著しく低下した。しかし、MS105 の過酸化水素消去活性は野生株と同等であった。さらに、大腸菌で発現、精製した組換え HprA1 タンパク質は、*in vitro* でタンパク質が鉄と結合し、ヒドロキシルラジカルの生成を抑制することを明らかにした。したがって、HprA1

タンパク質は、細胞内でも鉄と結合しヒドロキシルラジカルの生成を抑制することによって *L. casei* シロタ株の過酸化水素耐性に寄与していることが示唆された (Fig. 5-1)。

本研究において、*L. casei* シロタ株の酸化ストレス耐性に関わる遺伝子やそのメカニズムの一端を明らかにした (Fig. 5-1)。*L. casei* シロタ株は発酵乳の製造に使用されているプロバイオティクスであり、機能性の向上のために、高い菌数を維持した製品を提供、飲用することが重要である。また、製品の品質維持の点において、製造、流通、および保存時に受ける酸化ストレスに対して強い抵抗性を示すことが望まれる。本研究では、*L. casei* シロタ株の酸化ストレス耐性機構について基礎的な内容を明らかにしてきたが、本研究の成果を発酵乳の培養方法等に応用することで、生残性の改善や生理機能の向上等への貢献が期待できる。

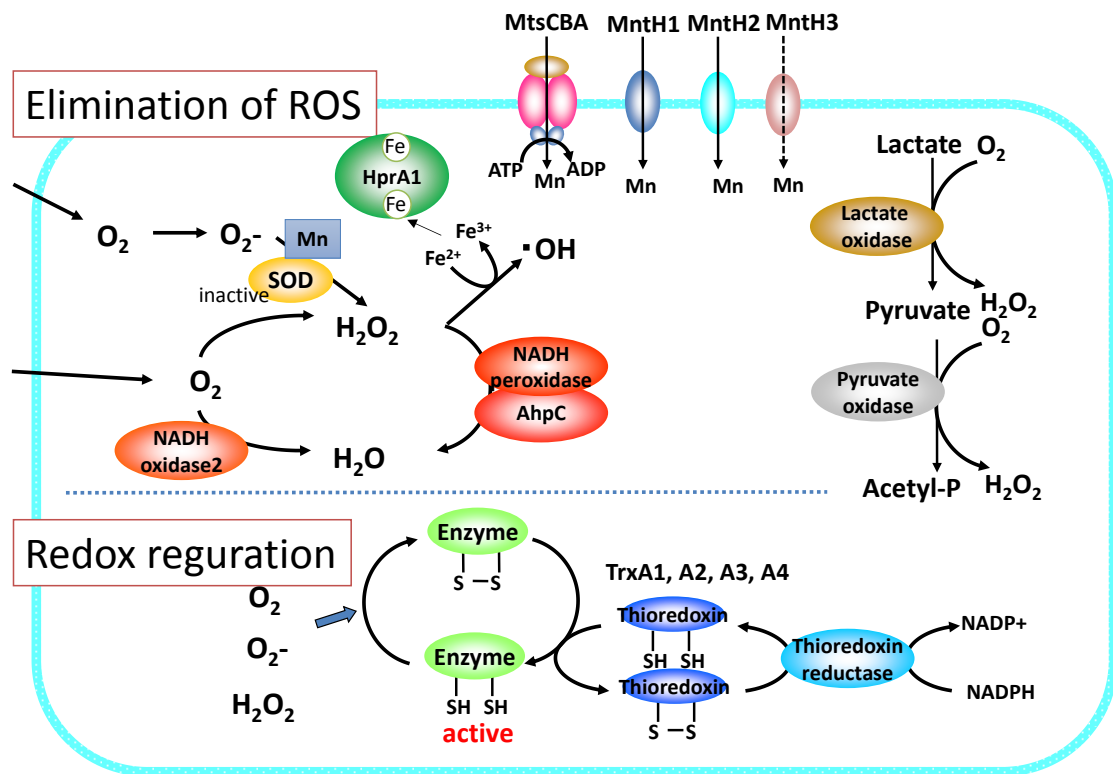


Fig. 5-1 Schematic diagram for oxidative stress resistance in *Lactobacillus casei* strain Shirota.

参考文献

1. 吉川 敏一, 河野 雅弘, 野原 一子. 2000. 活性酸素・フリーラジカルのすべて 健康から環境汚染まで. 丸善出版.
2. Higuchi M, Shimada M, Yamamoto Y, Hayashi T, Koga T, Kamio Y. 1993. Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H₂O₂-forming oxidase and H₂O-forming oxidase induced in *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 139: 2343-2351.
3. Higuchi M, Yamamoto Y, Poole LB, Shimada M, Sato Y, Takahashi N, Kamio Y. 1999. Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 181: 5940-5947.
4. Miyoshi A, Rochat T, Gratadoux JJ, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V. 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. Genet Mol Res 2: 348-359.
5. Zhang YW, Tiwari MK, Gao H, Dhiman SS, Jeya M, Lee JK. 2012. Cloning and characterization of a thermostable H₂O-forming NADH oxidase from *Lactobacillus rhamnosus*. Enzyme Microb Technol 50: 255-262.
6. Chang SK, Hassan HM. 1997. Characterization of superoxide dismutase in *Streptococcus thermophilus*. Appl Environ Microbiol 63: 3732-3735.
7. Sanders JW, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J. 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. J Bacteriol 177: 5254-5260.
8. Vance PG, Keele BB Jr, Rajagopalan KV. 1972. Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme. J Biol Chem 247: 4782-4786.
9. Archibald FS, Fridovich I. 1981. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. J Bacteriol 146: 928-936.
10. Archibald FS, Fridovich I. 1981. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol 145: 442-451.
11. Parsonage D, Miller H, Ross RP, Claiborne A. 1993. Purification and analysis of streptococcal

- NADH peroxidase expressed in *Escherichia coli*. J Biol Chem 268: 3161-3167.
12. Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L. 2002. *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. J Bacteriol 184: 6351-6356.
 13. Kono Y, Fridovich I. 1983. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. J Biol Chem 258: 6015-6019.
 14. Yamamoto Y, Poole LB, Hantgan RR, Kamio Y. 2002. An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation *in vitro*. J Bacteriol 184: 2931-2939.
 15. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 3906-3912.
 16. Chaillou S, Champomier-Verges MC, Cornet M, Crutz-Le Coq AM, Dudez AM, Martin V, Beaufile S, Darbon-Rongere E, Bossy R, Loux V, Zagorec M. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Nat Biotechnol 23: 1527-1533.
 17. Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1990-1995.
 18. van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto JM, Walunas T, Gibrat JF, Bessieres P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Maguin E. 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9274-9279.
 19. Ai L, Chen C, Zhou F, Wang L, Zhang H, Chen W, Guo B. 2011. Complete genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus casei* BD-II. J Bacteriol 193: 3160-3161.

20. Chen C, Ai L, Zhou F, Wang L, Zhang H, Chen W, Guo B. 2011. Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* LC2W. *J Bacteriol* 193: 3419-3420.
21. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15611-15616.
22. Maze A, Boel G, Zuniga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, Monedero V, Correia K, Jacques N, Beaufils S, Poncet S, Joyet P, Milohanic E, Casaregola S, Auffray Y, Perez-Martinez G, Gibrat JF, Zagorec M, Francke C, Hartke A, Deutscher J. 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* 192: 2647-2648.
23. Zhang W, Yu D, Sun Z, Wu R, Chen X, Chen W, Meng H, Hu S, Zhang H. 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia, China. *J Bacteriol* 192: 5268-5269.
24. Cai H, Thompson R, Budinich MF, Broadbent JR, Steele JL. 2009. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biol Evol* 1: 239-257.
25. Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, Stern U, Zunft HJ. 2003. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol* 17: 655-659.
26. Sur D, Manna B, Niyogi SK, Ramamurthy T, Palit A, Nomoto K, Takahashi T, Shima T, Tsuji H, Kurakawa T, Takeda Y, Nair GB, Bhattacharya SK. 2011. Role of probiotic in preventing acute diarrhoea in children: a community-based, randomized, double-blind placebo-controlled field trial in an urban slum. *Epidemiol Infect* 139: 919-926.
27. Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Watanabe K, Nanno M. 2006. Induction of

- interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. J Dairy Sci 89: 3306-3317.
28. Shida K, Takahashi R, Iwadate E, Takamizawa K, Yasui H, Sato T, Habu S, Hachimura S, Kaminogawa S. 2002. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. Clin Exp Allergy 32: 563-570.
 29. Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M. 2005. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. Clin Exp Immunol 140: 417-426.
 30. Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T. 2004. Antitumor activity and action mechanisms of *Lactobacillus casei* through the regulation of immune responses. Biofactors 22: 63-66.
 31. Naito S, Koga H, Yamaguchi A, Fujimoto N, Hasui Y, Kuramoto H, Iguchi A, Kinukawa N. 2008. Prevention of recurrence with epirubicin and *lactobacillus casei* after transurethral resection of bladder cancer. J Urol 179: 485-490.
 32. Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, Tanaka T, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda Y. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. Infect Immun 69: 1101-1108.
 33. Asahara T, Nomoto K, Watanuki M, Yokokura T. 2001. Antimicrobial activity of intraurethally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. Antimicrob Agents Chemother 45: 1751-1760.
 34. Takada M, Nishida K, Kataoka-Kato A, Gondo Y, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Kuwano Y, Miyazaki K, Rokutan K. 2016. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. Neurogastroenterol Motil 28: 1027-1036.
 35. 佐藤 隆, 白沢 幸生, 木脇 真祐美, 佐藤 澄江. 2004. 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム

解析 : *Lactobacillus casei* と *Bifidobacterium breve* のゲノム解析 腸内細菌学雑誌 18: 135-140.

36. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. J Biol Chem 244: 6049-6055.
37. Liu Q, Hang X, Liu X, Tan J, Li D, Yang H. 2012. Cloning and heterologous expression of the manganese superoxide dismutase gene from *Lactobacillus casei* Lc18. Ann Microbiol 62: 129-137.
38. Nierop Groot MN, Klaassens E, de Vos WM, Delcour J, Hols P, Kleerebezem M. 2005. Genome-based *in silico* detection of putative manganese transport systems in *Lactobacillus plantarum* and their genetic analysis. Microbiology 151: 1229-1238.
39. Hao Z, Chen S, Wilson DB. 1999. Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol 65: 4746-4752.
40. Crump KE, Bainbridge B, Brusko S, Turner LS, Ge X, Stone V, Xu P, Kitten T. 2014. The relationship of the lipoprotein SsaB, manganese and superoxide dismutase in *Streptococcus sanguinis* virulence for endocarditis. Mol Microbiol 92: 1243-1259.
41. Janulczyk R, Ricci S, Bjorck L. 2003. MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun 71: 2656-2664.
42. Johnston JW, Myers LE, Ochs MM, Benjamin WH Jr, Briles DE, Hollingshead SK. 2004. Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. Infect Immun 72: 5858-5867.
43. Paik S, Brown A, Munro CL, Cornelissen CN, Kitten T. 2003. The *sloABCR* operon of *Streptococcus mutans* encodes an Mn and Fe transport system required for endocarditis virulence and its Mn-dependent repressor. J Bacteriol 185: 5967-5975.
44. Forbes JR, Gros P. 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. Trends Microbiol 9: 397-403.
45. Que Q, Helmann JD. 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR,

- a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* 35: 1454-1468.
46. Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME. 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* 36: 1085-1100.
 47. Yasuda E, Serata M, Sako T. 2008. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 74: 4746-4755.
 48. Sambrook JW, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 49. Kiwaki M, Shimizu-Kadota M. 2002. Development of genetic manipulation systems and application to genetic research in *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Biosci Microflora* 20: 121-129.
 50. Parker MW, Blake CC. 1988. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett* 229: 377-382.
 51. Tu WY, Pohl S, Gray J, Robinson NJ, Harwood CR, Waldron KJ. 2012. Cellular iron distribution in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 194: 932-940.
 52. Bruno-Barcena JM, Andrus JM, Libby SL, Klaenhammer TR, Hassan HM. 2004. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl Environ Microbiol* 70: 4702-4710.
 53. Zuo F, Yu R, Feng X, Khaskheli GB, Chen L, Ma H, Chen S. 2014. Combination of heterogeneous catalase and superoxide dismutase protects *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 from oxidative stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 7523-7534.
 54. Lin J, Zou Y, Cao K, Ma C, Chen Z. 2016. The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative resistance in *Lactobacillus casei*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43: 703-711.
 55. Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-271.
 56. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV.

- Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 239: 3436-3444.
57. Arner ES, Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6102-6109.
 58. Carmel-Harel O, Storz G. 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* 54: 439-461.
 59. Fahey RC, Brown WC, Adams WB, Worsham MB. 1978. Occurrence of glutathione in bacteria. *J Bacteriol* 133: 1126-1129.
 60. Seo D, Kamino K, Inoue K, Sakurai H. 2004. Purification and characterization of ferredoxin-NADP⁺ reductase encoded by *Bacillus subtilis* *yumC*. *Arch Microbiol* 182: 80-89.
 61. Kosower NS, Kosower EM. 1995. Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol* 251: 123-133.
 62. Scharf C, Riethdorf S, Ernst H, Engelmann S, Volker U, Hecker M. 1998. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180: 1869-1877.
 63. Uziel O, Borovok I, Schreiber R, Cohen G, Aharonowitz Y. 2004. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. *J Bacteriol* 186: 326-334.
 64. Rocha ER, Tzianabos AO, Smith CJ. 2007. Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 189: 8015-8023.
 65. Serrano LM, Molenaar D, Wels M, Teusink B, Bron PA, de Vos WM, Smid EJ. 2007. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb Cell Fact* 6: 29.
 66. Gopal S, Borovok I, Ofer A, Yanku M, Cohen G, Goebel W, Kreft J, Aharonowitz Y. 2005. A multidomain fusion protein in *Listeria monocytogenes* catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis. *J Bacteriol* 187: 3839-3847.
 67. Janowiak BE, Griffith OW. 2005. Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*. *One*

protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. J Biol Chem 280: 11829-11839.

68. Akif M, Khare G, Tyagi AK, Mande SC, Sardesai AA. 2008. Functional studies of multiple thioredoxins from *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 190: 7087-7095.
69. Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ. 2003. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. Microbiology 149: 121-129.
70. Reott MA, Parker AC, Rocha ER, Smith CJ. 2009. Thioredoxins in redox maintenance and survival during oxidative stress of *Bacteroides fragilis*. J Bacteriol 191: 3384-3391.
71. Hisabori T, Motohashi K, Hosoya-Matsuda N, Ueoka-Nakanishi H, Romano PG. 2007. Towards a functional dissection of thioredoxin networks in plant cells. Photochem Photobiol 83: 145-151.
72. Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M. 2003. The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. J Biol Chem 278: 23747-23752.
73. Moller MC, Hederstedt L. 2008. Extracytoplasmic processes impaired by inactivation of *trxA* (thioredoxin gene) in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 190: 4660-4665.
74. Vido K, Diemer H, Van Dorsselaer A, Leize E, Juillard V, Gruss A, Gaudu P. 2005. Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*. J Bacteriol 187: 601-610.
75. Harris CL. 1981. Cysteine and growth inhibition of *Escherichia coli*: threonine deaminase as the target enzyme. J Bacteriol 145: 1031-1035.
76. Park S, Imlay JA. 2003. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. J Bacteriol 185: 1942-1950.
77. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. 1981. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. FEBS Lett 128: 347-352.

79. Huang TC, Lin RF, Chu MK, Chen HM. 1999. Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology* 145: 743-753.
80. Nakamura M, Saeki K, Takahashi Y. 1999. Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster. *J Biochem* 126: 10-18.
81. Takahashi Y, Nakamura M. 1999. Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem* 126: 917-926.
82. Ding H, Clark RJ, Ding B. 2004. IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J Biol Chem* 279: 37499-37504.
83. Wang W, Huang H, Tan G, Si F, Liu M, Landry AP, Lu J, Ding H. 2010. *In vivo* evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*. *Biochem J* 432: 429-436.
84. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. 2008. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 320: 1207-1210.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

第2章

Serata M, Yasuda E, Sako T. 2018. Effect of superoxide dismutase and manganese on superoxide tolerance in *Lactobacillus casei* strain Shirota and analysis of multiple manganese transporters. *Biosci Microbiota Food Health* in press.

第3章

Serata M, Iino T, Yasuda E, Sako T. 2012. Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei*. *Microbiology* 158: 953-962.

第4章

Serata M, Kiwaki M, Iino T. 2016. Functional analysis of a novel hydrogen peroxide resistance gene in *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Microbiology* 162: 1885-1894.

謝辞

本論文を作成するにあたり、多くのご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 小林達彦教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました、株式会社ヤクルト本社中央研究所 石川文保所長、南野昌信副所長に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました、株式会社ヤクルト本社中央研究所 左古知行博士に深く感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、多くのご指導、ご支援を賜りました、株式会社ヤクルト本社中央研究所 飯野透氏、木脇真祐美氏、安田恵美氏に深く感謝申し上げます。

最後に、終始心の支えとなってくれた家族に厚く御礼申し上げます。