

氏 名(本籍) やま 山 もと 本 ゆう 裕 じ 司

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 博 第 7 4 8 号

学位授与年月日 平 成 15 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻  
(博士課程)

学位論文題目 口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* における鉄結  
合蛋白質 (Dpr) を介した酸素耐性機構の解明

論文審査委員 (主 査) 教 授 神 尾 好 是  
(副 査) 教 授 勝 亦 瞭 一  
教 授 五 味 勝 也

# 論文内容要旨

## 序論

酸素は利用性の高い分子であると同時に活性酸素種に由来する細胞毒性を示す危険な存在である。酸素から生じるスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルといった活性種は、DNA、蛋白質、膜脂質に損傷を与える。このため、好気性の生物はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、グルタチオンなどの種々の活性酸素消去系を持つと考えられている。

乳酸菌は、そのエネルギー生産を嫌氣的な発酵に依存しており生育に酸素を必要としないが、一般に酸素に耐性を示し好氣的な条件でも生育できる。しかしながら、カタラーゼによる過酸化水素分解系をもたず、SODすらもたない菌が存在するため、他の好気性物とは異なった興味深い研究材料として、その酸素耐性機構の研究が行われてきた。乳酸菌のスーパーオキシド消去系としては、マンガン型のSODがStreptococci、Lactococci、およびLactobacilliの一部に見られるが、SOD蛋白質を持たない*Lactobacillus plantarum*では、細胞内に高濃度に蓄積したマンガン自体が、SOD様の活性を示すと報告されている。また、カタラーゼに代わる過酸化水素分解系の探索が行われ、マンガンを補欠因子とするマンガンカタラーゼやフラボプロテインであるNADHペルオキシダーゼが、*L. plantarum*と*Enterococcus faecalis*からそれぞれ見出されている。いずれの酵素も酵素化学的に非常に興味深いものであったが、その局在が特定の菌種に限られていたため、乳酸菌一般における過酸化水素耐性機構は不明であった。1993年に当研究室の樋口らは、*Streptococcus mutans*から水生成型(Nox-2)と過酸化水素生成型(Nox-1)の2種類のNADHオキシダーゼを見出した。さらにPooleらとの共同研究により、過酸化水素生成型NADHオキシダーゼであるNox-1が、その遺伝子上流に存在するAhpC成分と共にはたらくことで、2成分性のペルオキシダーゼとして機能することを明らかとした。両成分のうちAhpC成分は、ペルオキシレドキシシンとよばれ、古細菌から高等動物まで普遍的に存在する新しいペルオキシダーゼのファミリーに属することが近年明らかとなっており、乳酸菌においても広く局在し、カタラーゼに代わる過酸化水素分解系として機能していることが期待された。しかしながら、*S. mutans*の*ahpC*, *nox-1*両遺伝子の欠損株を作成し、好気条件下での生育能および過酸化物耐性能について検討した結果、両遺伝子の欠損株は好気条件下で生育できるだけでなく、野生株と同等の過酸化水素耐性能を保持していることが明らかとなった。

本博士論文では、*S. mutans*にAhpC, Nox-1の欠損を補償するより主要な過酸化水素耐性因子が存在すると仮定し、その探索を行った。その結果、新たな過酸化物耐性因子として鉄結合蛋白質であるDpr分子を見出した。また、Dpr分子の精製標品を取得しその分子的実態を明らかとすると共に、Dpr分子を介した酸素耐性メカニズムの解析を行った。さらに、Dpr様分子の乳酸菌における局在についても検討を行った。

## 1章、過酸化水素耐性遺伝子の取得

*E. coli*の*ahpCF*欠損株は有機の過酸化物である *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) に感受性を示し、tBHPを0.5 mM含むLB plateでは生育できない。このことを利用し、0.5 mMのtBHPを含むplate での*E. coli ahpCF*欠損株の生育能を復帰させる遺伝子を*S. mutans*のゲノムライブラリーから選抜し、525 bpからなり、175アミノ酸残基をコードする遺伝子を得た。相同検索の結果、得られた遺伝子がコードするタンパク質はDps (DNA binding protein starved cells) ファミリーのタンパク質と20~40%と低いながらも相同性を示したので(表1)、*dpr* (Dps like peroxide resistance gene)と名付けた。

## 2章、*dpr*欠損株の作製とその性質

*S. mutans*における*dpr*遺伝子の生理的役割について検討するため、相同組み換えを用い*S. mutans*の*dpr*欠損株を作製した。他の酸素傷害防御酵素との関連についても検討するため、*dpr*, *ahpC*, *nox-1*及び、*dpr*, *sod*欠損株も作製した。嫌気条件下では、これらの遺伝子欠損株は野生株と同等の生育能を示したが、好気条件では*dpr*欠損株のコロニー形成能は約1/10000に低下した(図1A)。また、*dpr*, *ahpC*, *nox-1*及び、*dpr*, *sod*欠損株は、好気条件下の液体培地でも顕著に生育が阻害され(図1B、C)、*dpr*遺伝子は*S. mutans*の酸素耐性に非常に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

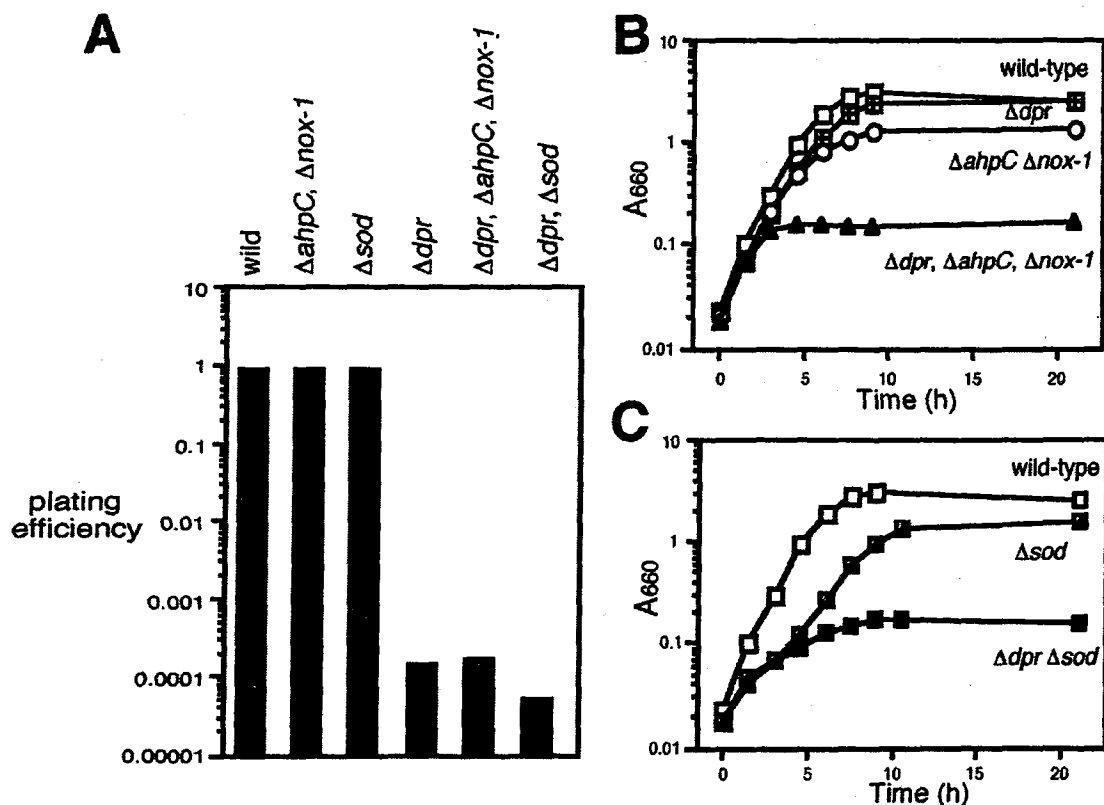


図1. *dpr*欠損株の好気条件下での生育能

A. コロニー形成能；嫌気条件下でのコロニー形成数に対する好気条件下でのコロニー形成数の比をplating efficiencyと定義した。B, C. 液体培地での生育能；各変異株を好気条件下で振とう培養(150cycle/min)し、その生育度をA660で測定した。

### 3章、dpr遺伝子産物の取得と解析

Dpr分子がどのように*S. mutans*に酸素耐性を付与しているのか明らかとするために、dpr遺伝子産物の取得と解析を行った。好氣的に培養した*S. mutans*の菌体約10 gから、ハイドロキシアパタイトを用いたバッチ法と3種のカラムクロマトグラフィーを用いて、精製度で約50倍、精製標品として約2.4mgのDpr蛋白質を得た(図2A)。Dpr分子は、SDS-PAGEで20 kDa(図2A)、沈降平衡法で223 kDa、動的光散乱法で292 kDaの分子量を示したことから、約12量体からなる複合体を形成していると考えられた。また、Dpr分子は直径約 9.2 nmの球状の粒子として電子顕微鏡で観察され、鉄結合蛋白質であるフェリチン(直径12.5 nm)と類似した形状であった(図2B)。精製したDpr分子は複合体当たり10.8-27.5個の鉄原子を持ち、最大で480個の鉄を結合することができた。Dprが属するDpsファミリーの蛋白質では、DNAとの非特異的な結合能が報告されている。Dprについても、大腸菌のDpsをポジティブコントロールとして用い、ゲルシフトアッセイを行ったが、DNAとの結合能は認められなかった。また、抗酸化酵素活性である、SOD活性とカタラーゼ活性についても検討したが、いずれの活性も検出されなかった。Dprと他のDpsファミリーのタンパク質の性質を表1に示した。

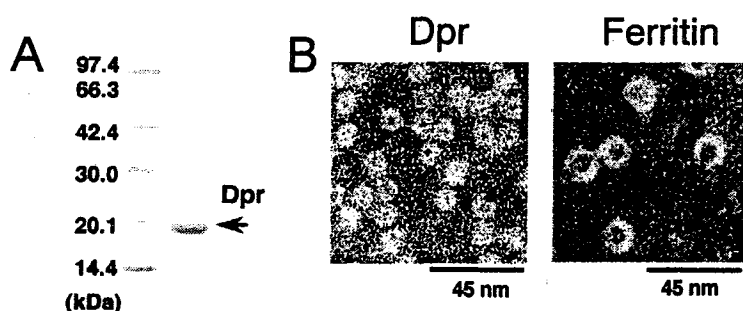


図2. Dpr 精製表品のSDS-PAGE(A)と電子顕微鏡写真(B)

表1. DprとDpsファミリーのタンパク質の特徴の比較

source	% identity with Dpr	M.W. (subunit)	subunits/complex	diameter	iron-binding activity	DNA-binding activity	reference
<i>S. mutans</i> Dpr	100.0	20,000	12	9.2	+	-	This study
<i>L. innocua</i> Ferritin	40.0	18,000	12	10.1	+	-	Bozzi, et al, 1997
<i>H. pylori</i> HP-NAP	26.1	17,000	12	9.6	+	-	Tonello, et al, 1999
<i>B. anthracis</i> DlpA	33.3	17,000	12	9.0	+	-	Papinutto, et al, 2002
DlpB	32.7	17,000	12	9.0	+	-	
<i>E. coli</i> Dps	27.1	19,000	12	9.0	+	+	Almiron, et al, 1992
<i>B. subtilis</i> MrgA	30.9	17,000	N.D.	9.2	N.D.	+	Chen, et al, 1995
<i>M. smegmatis</i> Dps	25.0	20,000	N.D.	N.D.	N.D.	+	Gupta, et al, 2002
<i>Synechococcus</i> sp. DpsA	21.5	22,000	N.D.	N.D.	+	+	Pena, et al, 1995

N.D. : not determined

#### 4章、Dpr蛋白質によるヒドロキシルラジカルの生成阻害

Dpr分子はいわゆるフェリチンのような鉄結合蛋白質の一種であった。大腸菌のDpsでは、DNAとDpsの強固な結合自体がDNAを過酸化水素から保護すると考えられている。しかし、*S. mutans*のDprにはDNAとの結合能は認められなかった。また、他の抗酸化酵素活性も認められないことから、Dprによる酸素耐性能は、その鉄結合能に由来すると考えられた。鉄イオンは、フェントン反応 ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ ) で知られるように、最も反応性の高い活性酸素種であるヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )の生成を触媒する。従って、推定されるDpr分子の機能は、生体内の遊離の鉄イオンのキレート作用によるヒドロキシルラジカルの生成抑制である。そこで、Dpr分子が鉄イオンに依存したヒドロキシルラジカルの生成を抑制しうるか否か無細胞の実験系を用い検討した。その結果、2価鉄に依存した系および3価鉄とスーパーオキシドに依存したいずれのヒドロキシルラジカルの産生系においても、Dpr分子はヒドロキシルラジカルの産生を効果的に抑制することが判明した(表2、3)。

表2. 2価鉄に依存したヒドロキシルラジカル生成に対するDprの影響

Addition to reaction mixture containing 10 $\mu\text{M}$ of iron(II)		Extent of hydroxyl radical formation (fluorescence units : A553)	Inhibition (%)
None		59.4 $\pm$ 3.1	-
+ Deferoxamine	10 $\mu\text{M}$	17.9 $\pm$ 4.9	69.9
+ Catalase	100 units /ml	35.7 $\pm$ 4.3	39.9
+ apo-Dpr	20 nM	14.8 $\pm$ 0.8	75.1
	100 nM	4.4 $\pm$ 0.5	92.6

表3. 3価鉄と $\text{O}_2^-$ に依存したヒドロキシルラジカル生成に対するDprの影響

Addition to reaction mixture containing xanthin, xanthin oxidase, and 5 $\mu\text{M}$ Fe(III)		Extent of hydroxyl radical formation (fluorescence units : A553)	Inhibition (%)
None		134.7 $\pm$ 12.7	-
+ Deferoxamine	10 $\mu\text{M}$	27.9 $\pm$ 0.9	79.3
+ Catalase	100 units/ml	9.7 $\pm$ 3.3	92.8
+ SOD	10 units/ml	8.5 $\pm$ 1.0	93.7
+ apo-Dpr	20 nM	75.9 $\pm$ 5.7	43.7
	100 nM	29.1 $\pm$ 5.5	78.4
	200 nM	23.4 $\pm$ 0.4	82.6

### 5章、野生株とdpr欠損株の細胞内遊離鉄イオン濃度の比較

Dpr分子による酸素耐性機構が、生体内の遊離の鉄イオンの制御によるものと仮定すると、野生株にくらべ、dpr欠損株では細胞内の遊離鉄イオンが増加していると推定される。この仮説を検証するために、生体内遊離鉄イオン濃度の測定をESR (Electron spin resonance) 法を用いて行った。その結果、嫌気条件下では野生株で $93.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 、dpr欠損株で $136.6 \pm 29.0 \mu\text{M}$ の遊離鉄イオンが検出された(図3B)。好気条件に移すことによって、野生株では $9.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$ に鉄イオン濃度が減少したのに対し、dpr欠損株では $96.1 \pm 12.0 \mu\text{M}$ と高く維持されていた(図3B)。また、野生株では遊離鉄イオン濃度の減少と比例して、Dprの発現が確認された(図3C)。以上の結果から、Dpr分子が生体内での鉄イオン濃度の調節に寄与していることが明らかとなった。これまでの結果から推定されるモデルを図4に示した。

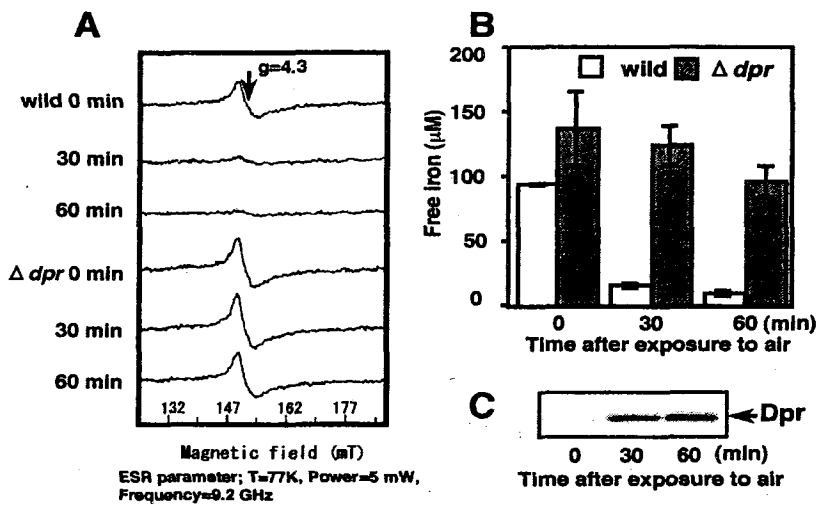


図3. ESRによる生体内遊離鉄イオンの測定

A. 野生株とdpr欠損株のESRスペクトル、B. 野生株とdpr欠損株の生体内遊離鉄イオン濃度 (Aの値を細胞の体積から換算した) C. 抗Dpr抗体を用いたwestern blotting

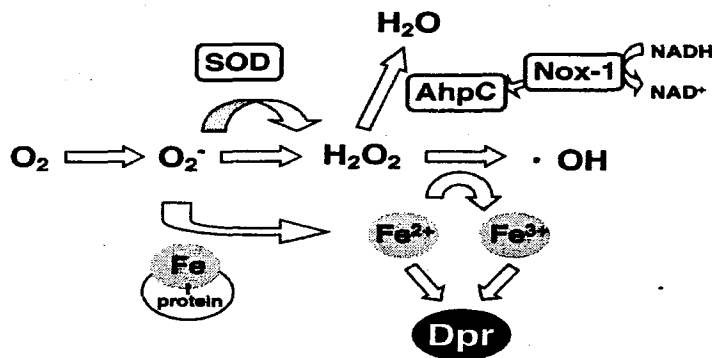


図4. *S. mutans*における活性酸素代謝のモデル図

酸素からスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ )、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )などの活性種が生じる。過酸化水素は鉄触媒によって、最も毒性の高いヒドロキシルラジカルに変換する。スーパーオキシドは、鉄を含む蛋白質から鉄を引き抜くことで、細胞内遊離鉄イオン濃度を増加させ、ヒドロキシルラジカルの産生量を増加させる。いずれの場合においても、鉄結合蛋白質であるDprが遊離の鉄イオンを分子内に取り込むことで、ヒドロキシルラジカルの産生を抑え、*S. mutans*に酸素耐性を付与していると考えられる

## 6章、Dpr様鉄結合蛋白質の乳酸菌における局在

Dpr様鉄結合蛋白質の乳酸菌における局在について検討した。Dpr様鉄結合蛋白質の検出には、鉄に特異的な染色試薬であるFerene Sを用いた活性染色と抗Dpr抗体を用いたwestern blot法を用いた。その結果、Dpr様の鉄結合蛋白質は、全てではないが乳酸菌に広く局在していることが判明した。また、乳酸菌は菌種により酸素耐性能が異なることが知られているが、Dpr様分子は、総じて酸素耐性能の高い乳酸菌に見られた。

Streptococci	
<i>S. mutans</i> (3)	A
<i>S. sanguls</i> (2)	A
<i>S. salivarius</i> (1)	A
<i>S. thermophilus</i> (4)	A
<i>Lactococcus lactis</i> (2)	B
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (1)	A
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (5)	-

Lactobacilli	
<i>L. plantarum</i> (4)	A
<i>L. paracasei</i> (1)	B
<i>L. gasserii</i> (1)	B
<i>L. reuteri</i> (1)	B
<i>L. paracasei</i> (2)	-
<i>L. delbrueckii</i> (5)	-
<i>L. acidophilus</i> (1)	-

図6. Dpr様鉄結合蛋白質の乳酸菌における局在

菌体破砕液を、非変性ポリアクリルアミド電気泳動により展開し、FereneSと抗Dpr抗体によるウエスタンブロットにより検出を行った。抗Dpr抗体で認識される鉄結合タンパク質をA、抗Dpr抗体で認識されない鉄結合タンパク質をBとして表記した。( )内は検体として用いた菌株数を示す。

## 要約

- 1、*S. mutans*より、過酸化物質耐性遺伝子として、525bpからなり175アミノ酸残基をコードする*dpr*遺伝子を取得した。
- 2、一連の*dpr*欠損株を作製することにより、*dpr*遺伝子が*S. mutans*の酸素耐性に非常に重要な因子であることを明らかとした。
- 3、Dpr蛋白質を*S. mutans*より精製し、Dpr分子は12量体からなるferritinのような鉄結合蛋白質であり、複合体当たり最大で480個の鉄原子を結合することを明らかとした。
- 4、Dpr分子は、*in vitro*において、鉄に依存したヒドロキシルラジカルの生成を抑制することを明らかとした。
- 5、*dpr*欠損株の細胞内遊離鉄イオン濃度が、野生株に比べ最大約10倍増加していることを見出した。
- 6、Dpr様の鉄結合蛋白質は、*S. mutans*だけでなく、広く乳酸菌に局在していることを見出した。

以上の結果から*S. mutans*では、鉄結合蛋白質であるDpr分子が細胞内の遊離の鉄イオンを分子内に取り込み、鉄イオン触媒によるヒドロキシルラジカルの生成を抑制することで、酸素耐性を付与していると考えられた。このDpr分子による酸素耐性メカニズムは、カタラーゼという過酸化水素分解系を持たない乳酸菌にとって、非常に都合の良いシステムと考えられ、実際にDpr様の鉄結合蛋白質は広く乳酸菌に分布していた。また、本研究で分離した一連の*dpr*欠損株は、酸素感受性株としても数少ない報告例であり、今後詳細に解析することで、鉄イオンあるいはヒドロキシルラジカルの細胞毒性の理解につながると期待される。



## 原著論文

- 1、 Yuji Yamamoto, Masako Higuchi, Leslie B. Poole, Yoshiyuki Kamio.  
Identification of a new gene responsible for the oxygen tolerance in aerobic life of *Streptococcus mutans*. (Preliminary Communication) Biosci. Biotech. Biochem., (2000) 64, 1106-1109.
- 2、 Yuji Yamamoto, Masako Higuchi, Leslie B. Poole, Yoshiyuki Kamio.  
Role of the *dpr* product in oxygen tolerance in *Streptococcus mutans*.  
J. Bacteriol., (2000), 182, 3740-3747.
- 3、 Yuji Yamamoto, Leslie B. Poole, Roy R. Hantgan, Yoshiyuki Kamio  
An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation *in vitro*. J. Bacteriol., (2002) 184, 2931-2939.
- 4、 Yuji Yamamoto, Koichi Fukui, Hiroaki Ohya, Yoshiyuki Kamio.  
Regulation of intracellular free iron level by an iron-binding protein, Dpr, in *Streptococcus mutans*. (投稿準備中)

## 参考論文

- 1、 Masako Higuchi, Yuji Yamamoto, Yoshiyuki Kamio. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress (Review). J. Biosci. Bioeng., (2000), 90, 484-493.
- 2、 Masako Higuchi, Yuji Yamamoto, Leslie B. Poole, Mamoru Shimada, Yutaka Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiyuki Kamio. Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol., (1999), 181, 5940-5947.
- 3、 山本裕司, 佐々木隆, 佐々木泰子, 本目佳子, 三宅泰司, 神尾好是.  
乳酸菌の酸素耐性メカニズム(ショートレビュー).  
日本農芸化学会誌, (2002), 76, 843-845.

## 論文審査結果要旨

活性酸素の生理活性、および活性酸素に対する生物の防御メカニズムは、基礎生物学の興味深い研究対象として、多くの研究が行われている分野の1つである。また、活性酸素が、加齢、癌をはじめとする様々な病体に関与することが近年明らかとなりつつあり、応用的見地からも注目を集める研究分野となっている。酸素から生じる活性酸素には、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどがある。これら活性酸素は反応性が高く、DNA、蛋白質、膜脂質などの生体構成成分に損傷を与えるため、酸素の存在下で生育する生物はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、種々のペルオキシダーゼを持つと考えられている。

本博士論文では、乳酸菌の一種である *Streptococcus mutans* を研究材料として、その酸素耐性機構の解明を行っている。乳酸菌は、一般に酸素に耐性を示し好氣的な条件でも生育できるが、カタラーゼによる過酸化水素分解系をもたず、SOD すらもたない菌が存在する。このため、他の好気性物とは異なった興味深い研究材料として、その酸素耐性機構の研究が行われてきた。本研究者は当初、カタラーゼ代替の過酸化水素消去酵素として *S. mutans* で見出された Alkyl hydroperoxide reductase (AhpR) に着目し研究を行った。しかしながら、AhpR 欠損株が、なおも酸素耐性を保持していることに注目し、さらに新たな酸素耐性因子の取得を試みた。結果として、大腸菌の AhpR 欠損株の過酸化物耐性を復帰させる遺伝子として、*dpr* (Dps like peroxide resistance gene) 遺伝子を見出した。そして、*S. mutans* の *dpr* 欠損株を作製することで、*dpr* 遺伝子が *S. mutans* の酸素耐性に非常に重要な因子であることを明らかとした。さらに、*dpr* 遺伝子産物の精製および解析を行い、Dpr 分子が、球状の12量体からなるいわゆる Ferritin のような鉄結合蛋白質であり、最大で480個の鉄原子を複合体あたり結合することを明らかとした。次に、Dpr 分子による酸素耐性メカニズムが、生体内の遊離鉄イオンのキレート作用による、鉄イオンを介したヒドロキシルラジカルの生成阻害によるものと仮定し、Dpr 分子がヒドロキシルラジカルの生成を阻害することを無細胞系の実験を用いて明らかとした。さらに、*S. mutans* の *dpr* 欠損株において、細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇していることを、Electronspin resonance 法を用いて示している。また、Dpr 様分子の *S. mutans* 以外の乳酸菌における局在について検討し、Dpr 様分子が広く乳酸菌に分布していることを見出している。

乳酸菌では、これまでカタラーゼ代替となりうるペルオキシダーゼの探索が主として行われてきたが、本研究では過酸化水素の分解に必ずしも依存しない新たな機構として、鉄結合蛋白質であるDpr分子による酸素耐性メカニズムを見出している。このDpr分子による酸素耐性機構は、カタラーゼをもたない乳酸菌にとって非常に都合の良いメカニズムであり、実際にDpr様分子が広く乳酸菌に分布していた事実も興味深い。また、Dprはそのアミノ酸配列の類似性から、Dpsファミリーという大腸菌で見出されたDNA結合蛋白質のファミリーに属することを明らかにした。

以上のように、本研究は *Streptococcus mutans* における Dpr を介した酸素耐性機構を解明したもので、審査員一同は、本研究者に博士(農学)の学位を授与するに値するものと認定した。