

博士論文

乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* における  
蛋白質分解系遺伝子の発現調節に関する研究

若井 丈人

## 目次

<b>第1章 緒言</b> .....	<b>3</b>
1.1. 乳酸菌について .....	3
1.2. 乳酸菌の蛋白質分解作用 .....	3
1.3. 乳酸菌の蛋白質分解系 .....	4
1.4. <i>L. helveticus</i> 種の蛋白質分解系 .....	5
1.5. 乳酸菌の機能と健康機能性ペプチド .....	6
1.6. 血圧降下ペプチドの産業利用と課題 .....	7
1.7. 本研究の目的とアプローチ .....	8
<b>第2章 <i>L. helveticus</i> CM4 株のゲノム解析と比較ゲノムによる血圧降下ペプチド 産生遺伝子群の推定</b> .....	<b>14</b>
2.1. 緒言 .....	14
2.2. 実験材料および方法 .....	15
2.2.1. 乳酸菌と培地・培養方法 .....	15
2.2.2. <i>L. helveticus</i> CM4 株の染色体 DNA 断片のクローニング .....	15
2.2.3. DNA 配列決定と遺伝子アノテーション .....	15
2.2.4. 菌体外プロテイナーゼ活性測定 .....	16
2.2.5. 発酵乳中の VPP および IPP の定量 .....	16
2.2.6. $\beta$ カゼイン分解物のペプチド解析 .....	17
2.2.7. ウェスタンブロッティング .....	17
2.3. 結果 .....	17
2.3.1. ゲノム配列解析 .....	17
2.3.2. 既存乳酸菌遺伝子群との相同性解析 .....	18
2.3.3. 蛋白質分解酵素遺伝子群の比較 .....	19
2.3.4. 菌体外プロテイナーゼのウェスタンブロッティング .....	19
2.3.5. 菌体外プロテイナーゼ活性と血圧降下ペプチド産生量の比較 .....	20
2.3.6. 菌体外プロテイナーゼによるカゼイン分解物の比較 .....	20
2.4. 考察 .....	21
<b>第3章 アミノ酸による <i>L. helveticus</i> CM4 株の蛋白質分解系の発現制御解析</b> ...	<b>32</b>
3.1. 緒言 .....	32
3.2. 実験材料および方法 .....	33
3.2.1. ペプチド、アミノ酸添加による <i>L. helveticus</i> CM4 株の血圧降下ペプチド産生量への 影響 .....	33
3.2.2. ペプチド添加による菌体外プロテイナーゼ活性測定 .....	34
3.2.3. DNA マイクロアレイ解析 .....	34
3.3. 結果 .....	34

3.3.1.	ペプチド添加による血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生抑制 .....	34
3.3.2.	ペプチド添加による菌体外プロテイナーゼ活性の抑制 .....	35
3.3.3.	単独のアミノ酸による血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生抑制 .....	35
3.3.4.	ペプチド添加による蛋白質分解系遺伝子の転写抑制 .....	36
3.3.5.	ペプチド添加による蛋白質分解系以外の遺伝子の転写への影響 .....	37
3.4.	考察 .....	37
<b>第4章</b>	<b>アミノ酸に応答する蛋白質分解系遺伝子の転写調節因子の解析 .....</b>	<b>48</b>
4.1.	緒言 .....	48
4.2.	実験材料および方法 .....	48
4.2.1.	DNA セファロースの調製 .....	48
4.2.2.	DNA 結合蛋白質の単離 .....	49
4.2.3.	形質転換大腸菌からの CBS ドメイン蛋白質の精製 .....	50
4.2.4.	ゲルシフトアッセイと共通モチーフ解析 .....	50
4.2.5.	形質転換大腸菌での <i>pepV</i> 遺伝子転写抑制 .....	51
4.2.6.	DNase I フットプリント解析 .....	52
4.2.7.	BCARR の C 末端の類似性解析 .....	52
4.2.8.	BCARR の相同蛋白質の系統樹解析 .....	52
4.3.	結果 .....	53
4.3.1.	DNA 結合蛋白質の分離・同定 .....	53
4.3.2.	CBS ドメイン蛋白質の DNA への結合(ゲルシフトアッセイ) .....	54
4.3.3.	形質転換大腸菌での CBS ドメイン蛋白質の転写調節 .....	54
4.3.4.	DNA モチーフ解析 .....	55
4.3.5.	BCARR 蛋白質の結合 DNA 領域の推定 .....	55
4.3.6.	DNase I フットプリント解析による DNA 結合領域の推定 .....	56
4.3.7.	BCARR 蛋白質のドメイン機能推定 .....	56
4.3.8.	BCARR の相同蛋白質の系統樹解析 .....	57
4.4.	考察 .....	57
<b>第5章</b>	<b>総合討論 .....</b>	<b>77</b>
5.1.	結果まとめ .....	77
5.2.	考察 .....	78
5.3.	今後の展望 .....	84
	略語 .....	86
	参考論文 .....	87
	論文の内容の要旨 .....	99
	謝辞 .....	103

## 第1章 緒言

### 1.1. 乳酸菌について

乳酸菌とは糖源を資化してエネルギーを得る過程で乳酸を産生する菌群の総称である。乳酸菌はグラム陽性、細胞形態は桿菌または球菌、カタラーゼ陰性、内性胞子を形成せず、運動性を示さない。16SrRNA 遺伝子配列解析の結果を踏まえた分類学上の乳酸菌として「乳酸桿菌目」(Order “Lactobacillales”)が提唱され、2009年の *Bergey’s Manual of systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> edition, vol.3* には6科33属が含まれる。乳酸菌は、ヒトを含む動物の腸管や植物や発酵乳など多岐にわたり生育する。乳酸菌は多くの伝統的発酵食品に含まれ、食品の風味醸成のみならず保存性の向上に寄与している。本論文における研究対象とした *Lactobacillus helveticus* (*L.helveticus*) 種は140以上の乳酸菌種の中でも最も蛋白質分解力が高いため、生育が速く、機能性ペプチドの生産性に富む、産業上の利用性の高い乳酸菌である。

以下、乳酸菌の製造における重要な性質を整理し、特に、本研究で対象とした機能性ペプチドの生産に必要な蛋白質分解系の特徴を整理した。

### 1.2. 乳酸菌の蛋白質分解作用

乳酸菌は発酵乳中に生産するさまざまな代謝産物が、発酵乳やチーズなどの製品の保存性向上、熟成風味やうまみ成分の付与など食品としての価値向上に有用であることから、古くから食品の加工に利用されてきた。一般的に乳酸菌は多くのアミノ酸を自ら合成することができず、その増殖には多くの種類のアミノ酸が必要である(アミノ酸要求性) (Slattery *et al.*, 2010)。一方、乳内には遊離アミノ酸が少ないため乳酸菌は乳内で増殖するために蛋白質分解系により乳培地中の蛋白質を分解してペプチドやアミノ酸を遊離させ、窒素源として利用することで生育する。乳酸菌の蛋白質分解系が損なわれると乳内での生育不良となる事から、発酵食品製造において蛋白質分解系は極めて重要と考えられている。

乳酸菌が持つ有用性として、食品の一次機能；栄養機能、二次機能；嗜好・食感機能、に加えて、近年三次機能；健康機能・生体調節機能としての役割に期待が高まっている。食品の一次機能の栄養機能に関しては、食品中の大きな蛋白質を乳酸菌の持つ蛋白質分解系によって、吸収性の良いペプチドやアミノ酸に分解することで、ヒ

トでの消化・吸収を助けると考えられる。二次機能の嗜好・食感機能としては、チーズやヨーグルトなどの発酵食品の風味、香気の付与が期待される。例えば、乳酸菌により生産されるアミノ酸、ペプチドなどが旨味などの呈味を付与し、さらにアミノ酸の一部はさらに代謝され香気成分が産生される。ここでチーズの香気は、蛋白質分解系により切り出されたアミノ酸が代謝されて香気が生産され、ペプチドなどがテクスチャや呈味に影響を与える(Smit *et al.*, 2005)。また、チーズで課題となる苦味を有するペプチドに関しても、*L. helveticus* 種の乳酸菌によってβ-カゼイン(f193-209)などの苦味ペプチドが分解され、チーズの苦味が著しく抑えられることが報告されている(Sadat-Mekmene *et al.*, 2011)。三次機能の健康機能・生体調節機能については、上述のように乳酸菌の蛋白質分解系が食品中の蛋白質を分解することによって産生される一部のペプチドが保健効果を示すことや、乳酸菌自体にさまざまな生理効果を示すものがあることが知られている(段落 1.5.に後述)。

### 1.3. 乳酸菌の蛋白質分解系

乳酸菌の蛋白質分解系は3つに大別することができる。①菌体外プロテイナーゼ：乳酸菌の菌体外の表層に局在し、乳中の主要な蛋白質であるカゼインなどを分解するための蛋白質分解酵素でペプチドを遊離する。②トランスポーター：菌体外プロテイナーゼによって遊離されたペプチドをそのペプチドのサイズに応じて、菌体内に取り込むためのもので、ジ・トリペプチドトランスポーター、オリゴペプチドトランスポーター等が存在する。③菌体内ペプチダーゼ：菌体内に取り込まれたペプチドをアミノ酸にまで分解するための酵素で、アミノ末端に作用するアミノペプチダーゼ、ペプチドの内部配列に作用するエンドペプチダーゼなどが存在するが、乳酸菌においてはカルボキシ末端に作用する酵素の報告は無い。

乳酸菌のなかでも乳酸球菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) 種の蛋白質分解系については、チーズ製造時の発酵不良と菌体内の巨大プラスミドの欠失の関係解析を通して、乳内生育に必須の乳糖資化性遺伝子と蛋白質分解系遺伝子がプラスミドにコードされていた事が明らかとなり詳細な研究が進められた。*L. lactis* 種は菌体外プロテイナーゼとして、PrtP を保有し、そのプロテイナーゼの活性化因子として PrtM が存在する(Siezen, 1999)。PrtP は活性を保有しないプレプロ体として翻訳され、細胞外への分泌の際にシグナル配列が切断されプロ体となり、菌体外で PrtM のシャペロン様の働きによって、プロ配列を自己消化によって切断し、活性型 PrtP となる。PrtP

によって乳蛋白質の分解で遊離されたペプチドは、ペプチドトランスポーターなどの輸送体によって菌体内に取り込まれる。菌体内に取り込まれたペプチドは、菌体内の多くのペプチダーゼによってアミノ酸に分解される(図 1.1)。

#### 1.4. *L. helveticus* 種の蛋白質分解系

*L. helveticus* 種は、乳酸菌の中で最も高い蛋白質分解活性を有し、乳中の蛋白質からのペプチド生産性も最も高く、多種多様で多量のペプチドやアミノ酸を遊離する(Meisel & Bockelmann, 1999; Slattey *et al.*, 2010)。*L. helveticus* 種の蛋白質分解系についてもさまざまな報告がされている。特に、菌体外プロテイナーゼは培地中の蛋白質を最初に分解し、乳中での生育に必須であるため多くの研究がなされている。*L. helveticus* 種の菌体外プロテイナーゼについては、*L. lactis* 種のようにプラスミド上にコードされた遺伝子の報告が無く、球菌と異なるタイプの菌体外プロテイナーゼや多種類の遺伝子の存在が報告されている。*L. helveticus* CNRZ32 株のゲノム配列からは、4 種類の菌体外プロテイナーゼと推定される遺伝子 *prtH*、*prtH2*、*prtH3*、*prtH4* の存在の可能性が報告されている(Broadbent *et al.*, 2011; Genay *et al.*, 2009)。また、プロテイナーゼ遺伝子群の PCR 増幅断片の解析により、他の *L. helveticus* 種の菌株にも 1 菌株中に 1 種から 4 種類の菌体外プロテイナーゼ遺伝子を保有するという報告がある(Broadbent *et al.*, 2011)。さらに、菌体外プロテイナーゼ *prtH* 遺伝子を欠損した *L. helveticus* 種菌株でも乳中での生育速度が変わらないため、*L. helveticus* 種は数種類のプロテイナーゼを同時に発現している可能性も示されている(Pederson *et al.*, 1999)。遺伝子配列からの解析は上述のように多くの報告があるが、菌体外プロテイナーゼの単離・精製が困難なため、その酵素学的特徴を同時に明らかにした報告は少ない。そのなかで、*L. helveticus* CP790 株からは、活性のある 45kDa の細胞表層プロテイナーゼ PrtY が単離され、その配列が決定されている(Yamamoto *et al.*, 2000)。他の *L. helveticus* 種菌株からも 180kDa 程度の菌体外プロテイナーゼの単離が報告されているが(Martín-Hernández *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 1997; Scolari *et al.*, 2006)、その配列決定はされておらず、PrtH 分子種の推定分子量と等しいことから PrtH 分子種の菌体外プロテイナーゼと考えられている。このように *L. helveticus* 種の菌体外プロテイナーゼは、他菌種と比べ多様性をもっているため、分子種ごとの活性の強弱や、菌株ごとにどの分子種を機能的に発現しているかは不明なままである。また、菌体外プロテイナーゼの活性化についても、CP790 株の PrtY において、その

活性化に必要な因子の存在が示されているが(Yamamoto & Takano, 1997)、その蛋白質や遺伝子の解析にまでは至っていない。

菌体内のペプチダーゼについては、*L. helveticus* CNRZ32 株でよく研究されており、エンドペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、プロリンペプチダーゼ、トリ/ジペプチダーゼの存在が報告されている(Slattery *et al.*, 2010)(図 1.2)。また、トランスポーターに関しても *L. lactis* 種と同様にアミノ酸トランスポーター、ジ・トリペプチドトランスポーター、オリゴトランスポーターの存在が報告されている(Callanan *et al.*, 2008)。以上のように *L. helveticus* 種の蛋白質分解系についての部分的な報告はあるが、蛋白質分解系全体への理解は不十分であり、*L. helveticus* 種が乳酸菌の中でも活性が高い要因など不明のままである。さらに、菌株ごとに多様な蛋白質分解系酵素を保持することが示されており、蛋白質分解活性が高い *L. helveticus* 種菌株の蛋白質分解系の網羅的な解析が期待される。

#### 1.5. 乳酸菌の機能と健康機能性ペプチド

乳酸菌の乳内での発酵に伴い発酵乳の一次機能や二次機能が高まることに加えて、三次機能；健康機能・生体調節機能についても、近年さまざまな保健効果がヒト試験において実証され、産業上の利用に期待が集まっている。特に、腸内菌叢の改善(Yamano *et al.*, 2006)や腸疾患の予防(Clements *et al.*, 1983)、血中コレステロール低減効果(Taranto *et al.*, 2000)、がん予防・治療(Bogdanov *et al.*, 1975; Ohashi *et al.*, 1989; Shahani & Chandan, 1979)、免疫調節機能(Isolauri *et al.*, 2001; Namba *et al.*, 1981; Sato, 1984; Simone *et al.*, 1987; Yokokura *et al.*, 1986)、血圧降下作用(Inoue *et al.*, 2003; Jauhiainen *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 1995a; Nakamura *et al.*, 1995b; Saito, 2008)などについては多くの研究成果が報告がされている。発酵乳などの乳酸菌発酵食品の保健効果は、乳酸菌の菌体成分による生理活性と乳酸菌が発酵乳中に産生する物質による生理活性の2つに大別できる。乳酸菌が産生する物質としては、特にペプチドの保健効果についての研究が盛んに行われ、多くの生理活性を持つペプチドが報告されている(表 1.1)(Hartmann & Meisel, 2007; Meisel & Bockelmann, 1999)。

乳酸菌や発酵乳の様々な保健効果の中で、血圧降下作用に関しては蛋白質分解活性が最も高い *L. helveticus* 種の発酵乳に特徴的なものとして報告されている(Yamamoto *et al.*, 1994b)。 *L. helveticus* 種発酵乳の主要な血圧降下ペプチド成分と

して、カゼイン分子から蛋白質分解系の作用により発酵乳の中に生産される Val-Pro-Pro (VPP)と Ile-Pro-Pro (IPP)の 2 種類のトリペプチドが単離されている (Nakamura *et al.*, 1995a)。

VPP と IPP の 2 種類のトリペプチドの血圧降下作用は、特に詳細な研究が行われ、動物試験やヒトでの症例研究が数多く行われその有効性が実証されている。また、近年多くの症例試験成績を統合して有用性を解析する手法(メタ解析法)によっても、有効性を実証する報告が複数報告されている(表 1.2)(Boelsma & Kloek, 2009; Cicero *et al.*, 2010a; Pripp, 2008; Xu *et al.*, 2008)。また、生体内での作用メカニズムについても解析が進められており、VPP および IPP が血管内皮に働きかけ血管拡張物質である一酸化窒素(NO)の産生を促進することが明らかとなっている(Hirota *et al.*, 2011)。加えて、両ペプチドは *in vitro* でのアンジオテンシン I 変換酵素(ACE) (Hannon *et al.*)を阻害する作用物質として単離されたが(Clements *et al.*, 1983; Nakamura *et al.*, 1995a)、近年、消化管からの吸収、血中への移行、血管組織への蓄積が動態試験を通して示され(Kawaguchi *et al.*, 2012)、また組織での遺伝子発現解析結果から組織における ACE 阻害作用(*in vivo* ACE 阻害活性)が示唆されている(Yamaguchi *et al.*, 2009)。

*L. helveticus* 種の蛋白質分解系については段落 1.4 で述べたとおり、部分的に報告がなされている。そのため *L. helveticus* 種による血圧降下ペプチド VPP と IPP の切り出しに関与すると考えられる蛋白質分解系酵素群についても一部推察されているものの、加工に重要な酵素群の特定は十分には行われていない。今後の様々な機能性ペプチドの食生活を通しての利用を考えた場合、その生産強化のために重要な蛋白質分解系遺伝子群の理解、さらにはそれら遺伝子群の発現機構の解明が必要である。

## 1.6. 血圧降下ペプチドの産業利用と課題

既に記載のように、多くの症例試験成績を基に VPP および IPP を含む *L. helveticus* 種発酵乳を使用した飲料が特定保健用食品として許可され(1997 年)、「血圧が高めの方に適した食品」として販売されている。その後、生産性の向上、風味の改良などを目的として *L. helveticus* 種の中で菌体外プロテイナーゼ活性が高く、VPP と IPP の生産性が高い株として、*L. helveticus* CM4 株が単離、特許化され(EU patent, 1016709, 1991)、製品利用されている。その後、我々も血圧降下ペプチドをさらに強化した発酵乳の開発を目的として、VPP、IPP の生産性の高い株の育種・改良、およ



び発酵方法の検討を行ってきたが、その理論収率は 25%程度であり（未発表データ）、さらなる高生産乳酸菌の分離には限界がある。その理由の一つとして発酵乳内に蓄積されたペプチドによる蛋白質分解系の遺伝子発現制御の可能性が考えられる。この現象は *L. lactis* 種において、CodY システムによる蛋白質分解系の制御として近年詳細に解析され報告されている (den Hengst *et al.*, 2005b)。すなわち CodY と呼ばれる転写調節因子が菌体内に蓄積した分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) と結合し、自身の DNA 結合性を高め、蛋白質分解系遺伝子の転写調節領域に存在する特異的な DNA 配列 (シスエレメント ; codY-box) に直接結合することで、蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制する (den Hengst *et al.*, 2005b)。転写調節因子 CodY が菌体内の BCAAs を感知し蛋白質分解系遺伝子の転写を調節することによって、アミノ酸の供給状態に応じて、効率よく蛋白質分解系の発現を制御していると考えられている (図 1.1)。

*L. helveticus* 種においても、蛋白質分解系の活性制御と考えられる現象が確認されている。*L. helveticus* 種の菌体外プロテイナーゼ活性は、乳培地中の対数増殖期初期で最も高い活性を示すが、アミノ酸やペプチドが蓄積される培養後期や、アミノ酸やペプチドが豊富な MRS 培地などで培養した場合では活性は常に低いことが確認されている。また、合成培地へのカザミノ酸、カジトンなどカゼインの酸加水分解物 (アミノ酸や短鎖ペプチド) の添加により、著しい菌体外プロテイナーゼ活性の低下が報告されている (Hebert *et al.*, 2000)。さらに、我々の研究で菌体外プロテイナーゼの活性化過程がペプチド添加により抑制されることで、酵素活性の発現が抑制される事を明らかにしている (Yamamoto *et al.*, 1995)。しかし、*L. lactis* 種におけるアミノ酸に応答する転写調節因子 CodY のような発現調節機構の存在や詳細システムに関しては、*L. helveticus* 種においては全く不明である。今後、様々な発酵乳内のペプチドの保健効果の有効利用を目指し、さらに蛋白質分解活性が高い菌株の育種・選抜、または効率的な発酵方法への改良を考えた場合、その生産強化のためには、蛋白質分解系遺伝子群の発現調節機構の解明が必須である。

## 1.7. 本研究の目的とアプローチ

本研究の目的は、蛋白質分解活性が高い *L. helveticus* CM4 株の機能性ペプチド産生に重要な蛋白質分解系の解明とそれを通してのその遺伝子発現制御システムの解析である。具体的には、ゲノム解読による全蛋白質分解系遺伝子群の解析、発酵乳中に生産されるペプチドによる関連遺伝子群の転写への影響評価、さらにはその転写

調節に関わる分子の特定とそれによる転写制御機構解析である。本研究を通して得られる情報を活用し、乳酸菌の育種、発酵条件の検討等の応用研究を実施することにより、乳酸菌発酵乳内での血圧降下ペプチドを初めとした機能性ペプチドの産生強化による機能性発酵乳あるいはその加工品や原料の開発と提供に応用することが最終的な目標である。

本研究ではまず、第2章においては蛋白質分解活性が高い *L. helveticus* CM4 株の全蛋白質分解系遺伝子群の解析とそれを通して機能性研究が進んでいる血圧降下ペプチド産生に関与する重要な酵素群の考察を行う。蛋白質分解系遺伝子群の解析においては、CM4 株の全ゲノム配列解析による全体的な蛋白質分解系遺伝子群の理解を目的とした。さらに既に全ゲノム配列が報告されている DPC4571 株の蛋白質分解系遺伝子群との配列比較や血圧降下ペプチド生産性や酵素活性の比較を行い、血圧降下ペプチド加工における重要な酵素の考察、およびそれを通しての CM4 株の特徴付けを目的とした。

次に第3章では、得られたゲノム配列をもとに蛋白質分解系遺伝子群の転写レベルでの発現調節の解析を目的とした。全遺伝子に特異的な DNA チップを作製し、乳培地にペプチド・アミノ酸混合物を添加し、利用しやすい窒素源が過剰な状態での遺伝子転写量を網羅的に解析する。ペプチドの添加による網羅的な遺伝子の転写量、菌体外プロテイナーゼ活性、および血圧降下ペプチド産生量への影響を確かめ、蛋白質分解系の発現制御機構の理解とその結果としての血圧降下ペプチド産生への影響を考察することを目的とした。

第4章においては、第3章で見出されたペプチドによる蛋白質分解系遺伝子の転写調節機構の解明を目的とした。転写調節に関与する因子がアミノ酸に応答し制御下にある遺伝子群の上流との親和性を上昇させると仮説をたて、蛋白質分解系遺伝子群の上流領域を結合したアフィニティー樹脂による DNA 結合蛋白質の単離、同定と、その配列上の特徴解析を行う。その後、同定蛋白質を大腸菌を用いて大量調整し、DNA への結合性を評価する。また、結合 DNA 配列に特徴的なモチーフ(シスエレメント)の解析をし、転写調節因子としての特徴を解析した。一方、乳酸菌 *L. helveticus* CM4 株での形質転換が困難であり、遺伝子欠失体の分離が出来ないため、大腸菌内に転写調節因子遺伝子と制御遺伝子を導入し転写調節能の確認を行う。これらの研究を通して、既存の転写調節因子との性質や構造上の特徴比較を行うことによって、蛋白質分解系の転写調節機構の解明を目的とした。

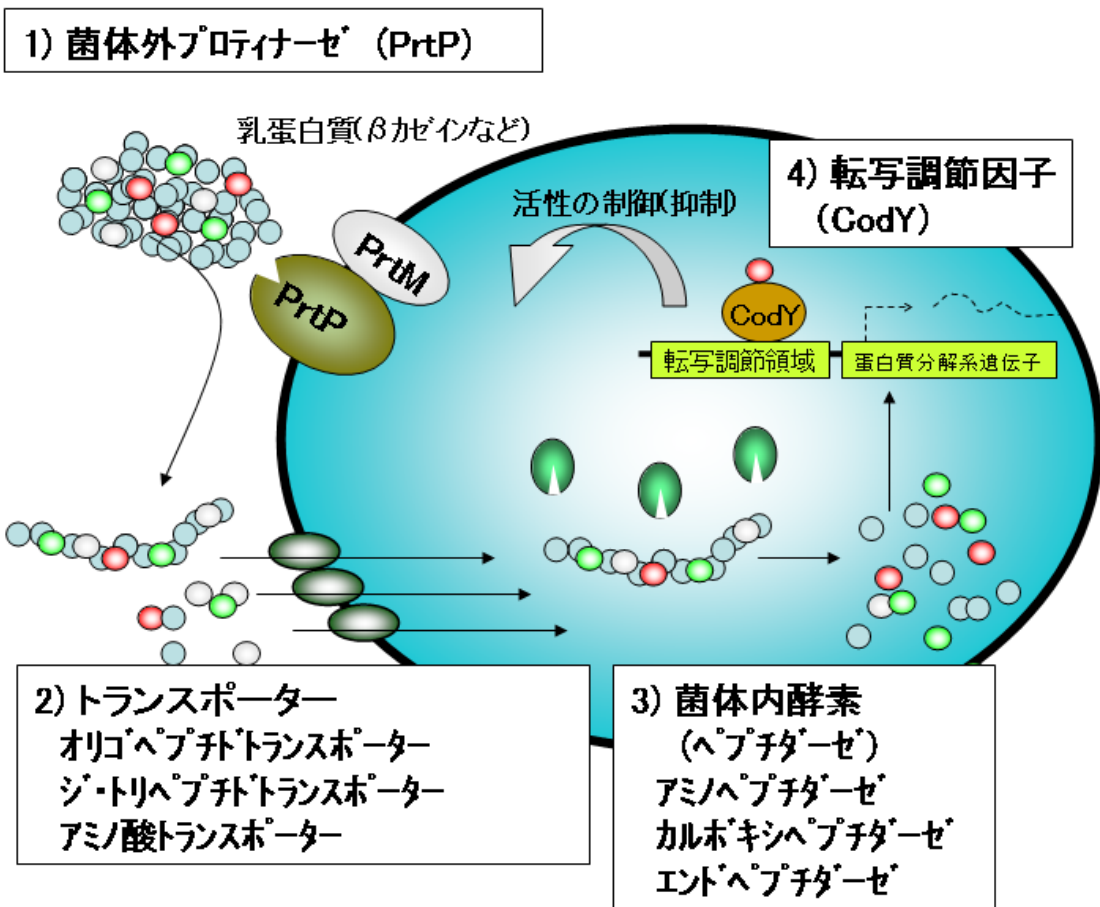
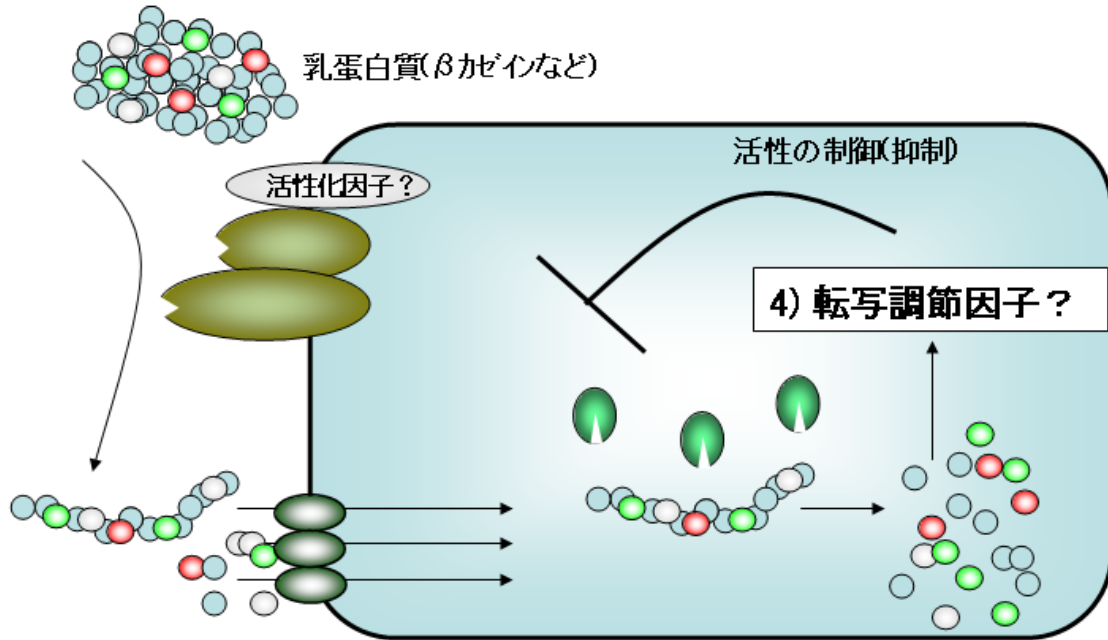


図 1.1 乳酸球菌 *Lactococcus lactis* 種で報告されている蛋白質分解系とその遺伝子発現制御システム 細胞外の蛋白質を効率よく分解・利用するため、菌体外プロテナーゼで蛋白質をオリゴペプチドに分解し、トランスポーターで細胞に取り込み、菌体内のペプチダーゼでアミノ酸まで分解する。分解されたアミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸が細胞内に蓄積すると、転写調節因子が分岐鎖アミノ酸と結合し、蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制し、活性を制御する。

PrtP; 菌体外プロテナーゼ、PrtM; プロテナーゼ活性化因子、CodY; アミノ酸応答転写調節因子

1) 菌体外プロテナーゼ (PrtY, PrtH1~4)



- 2) トランスポーター  
 オリゴペプチドトランスポーター  
 ジ・トリペプチドトランスポーター  
 アミノ酸トランスポーター

- 3) 菌体内酵素  
 (ペプチダーゼ)  
 アミノペプチダーゼ  
 カルボキシペプチダーゼ  
 エンドペプチダーゼ

図 1.2 乳酸桿菌 *Lactobacillus helveticus* 種で報告されている蛋白質分解系の概略  
 乳酸球菌 *L. lactis* 種と同様に(1)細胞表層プロテナーゼ、(2)トランスポーター、(3)菌体内ペプチダーゼの報告がある。しかし、菌体外プロテナーゼの活性化因子および活性制御機構については、存在の可能性が示唆されているものの明らかとなっていない。

表 1.1 乳蛋白質分解物から見出された生理活性ペプチド例

生理活性機能	ペプチド配列 <sup>a</sup>	由来乳蛋白質	参考文献
血圧降下作用 (アンジオテンシン変換酵素 阻害)	VPP、IPP、KVOPVP(E)、YP	β カゼイン、κ カゼイン、	(Maeno <i>et al.</i> , 1996; Nakamura <i>et al.</i> , 1995a; Yamamoto <i>et al.</i> , 1994a)
	DKIHPF、YQEPVL	β カゼイン	(Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> , 2004)
	SKVYFPFGPI、SKVYP	β カゼイン	(ASHAR & CHAND, 2004)
鎮痛作用  (オピオイド受容体結合)	RYLGYLE、YGFQNA、YLLF NH <sub>2</sub> 、	α S1 カゼイン、BSA、β ラクトグロブリン	(Loukas <i>et al.</i> , 1983; Mullally <i>et al.</i> , 1996; Tani <i>et al.</i> , 1994)
	YIPIQYVLSR、YLGSGY-OCH <sub>3</sub>	κ カゼイン、ラクトフェリン	(Chiba <i>et al.</i> , 1989; Yamamoto <i>et al.</i> , 1994a)
免疫調節	LLY、YQQPVLGPVR	β カゼイン	(Meisel & Schlimme, 1994; Migliore-Samour <i>et al.</i> , 1989)
ミネラル吸収促進	QMEAES*IS*S*S*EEIVPNS*VEQK	α S1 カゼイン	(Gobbetti <i>et al.</i> , 2002)
抗血栓作用	MAIPPKKNQDK、KDQDK、KRDS	κ カゼイン、ラクトランス フェリン	(Jollès <i>et al.</i> , 1986; Qian <i>et al.</i> , 1995a; Qian <i>et al.</i> , 1995b)
抗菌作用	α S2 カゼイン(f165-203)、α S1 カ ゼイン(f1-23)、 ファクトフェリン(f17-41)	α S2 カゼイン、α S1 カゼ イン、ラクトフェリン	(Bellamy <i>et al.</i> , 1994; Lahov & Regelson, 1996; Shin <i>et al.</i> , 1998; Tomita <i>et al.</i> , 1991; Zucht <i>et al.</i> , 1995)
抗酸化作用	ARHPHPLSFM	κ カゼイン	(Kudoh <i>et al.</i> , 2001)
	VKEAMAPK	β カゼイン	(Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> , 2004)
脳機能改善作用	β カゼイン(f73-91)	β カゼイン	(Osawa <i>et al.</i> , 2012)

a; アミノ酸の一文字表記を使用、S\* はリン酸化セリンを示す、長いペプチドは、「由来蛋白質(f配列番号)」で表す。

表 1.2 VPP および IPP のヒト試験メタ解析結果 [(Cicero *et al.*, 2010a)の結果から一部修正し引用]

試験者数(人)		有効成分とドーズ VPP, IPP, その他	摂取期間 (週)	血圧降下作用 (収縮期血圧, mmHg)		報告論文
アクティブ	プラセボ			平均	標準偏差	
17	13	1.5mg VPP、1.1mg IPP	8	-9.7	12.9	(Hata <i>et al.</i> , 1996)
15	15	2.53mg VPP、1.52mg IPPs	8	-13.2	7.8	(Kajimoto <i>et al.</i> , 2001b)
42	39	2.52mg VPP、1.64mg IPP	8	-10.1	11	(Kajimoto <i>et al.</i> , 2001a)
16	16	2.66mg VPP、1.60mg IPP	8	-12.1	10.2	(Hirata <i>et al.</i> , 2002)
10	7	1.5mg VPP、1.1mg IPP	8	-10.8	10.4	(Seppo <i>et al.</i> , 2002)
22	17	2.5mg VPP、2.25mg IPP	8	-6	10.8	(Seppo <i>et al.</i> , 2003)
23	23	1.92mg VPP、1.15mg IPP	4	-1.5	11	(Mizushima <i>et al.</i> , 2004)
30	29	2.5mg VPP、2.5mg IPP	10	-2.3	12.6	(Tuomilehto <i>et al.</i> , 2004)
20	20	8.3mg VPP、4.7mg IPP	4	-3	9	(Aihara <i>et al.</i> , 2005)正常高値血圧
20	20		4	-10.5	13.5	(Aihara <i>et al.</i> , 2005)軽症高血圧
53	55	30mg VPP、22.5mg IPP	10	-2	10.5	(Jauhainen <i>et al.</i> , 2005)
12	12	3.6mg VPP、IPP	6	-2	5.7	(Mizuno <i>et al.</i> , 2005)正常高値血圧
21	20		6	-12.2	10.9	(Mizuno <i>et al.</i> , 2005)軽症高血圧
72	72	1.47mg VPP、1.6mg IPP	12	-4.1	7.7	(Sano <i>et al.</i> , 2005)
103	32	4.2-5.4mg IPP、5.0-5.8mg VPP	8	1.4	1.5	(Engberink <i>et al.</i> , 2008)
136	139	4.4mg VPP、5.8mg IPP	8	0.4	0.8	(van der Zander <i>et al.</i> , 2008)
31	38	4.4mg VPP、5.8mg IPP	4	0	1	(van Mierlo <i>et al.</i> , 2009)
45	48	1.9mg VPP、2.7mg IPP(+ 350 mg カリウム)	4	-0.7	0.9	(van Mierlo <i>et al.</i> , 2009)
42	41	1.17mg VPP、1.13mg IPP	8	0.2	2.1	(de Leeuw <i>et al.</i> , 2009)
44	41	2.26mg VPP、2.30mg IPP	8	-1.3	3.4	(de Leeuw <i>et al.</i> , 2009)
41	41	4.47mg VPP、4.56mg IPP	8	-2.5	4.3	(de Leeuw <i>et al.</i> , 2009)
15	13	2.4mg VPP、4.3mg IPP	8	-3.4	1.7	(Yoshizawa <i>et al.</i> , 2009)
33	33	4mg VPP、2mg IPP	4	-1.3	7	(Cicero <i>et al.</i> , 2010b)正常血圧
22	22		4	-1	8.5	(Cicero <i>et al.</i> , 2010b)正常高値血圧
メタ解析結果				-3.73	(95% CI: -6.75, -1.76)	

## 第2章 *L. helveticus* CM4 株のゲノム解析と比較ゲノムによる血圧降下ペプチド産生遺伝子群の推定

### 2.1. 緒言

第1章に記載のように、*L. helveticus* CM4 株は、菌体外プロテイナーゼ活性が高く、血圧降下ペプチド VPP と IPP の乳蛋白質からの産生量が多い株として単離された(EU patent, 1016709, 1991)。VPP と IPP の2種類のトリペプチドは主要な乳蛋白質である $\beta$ カゼインからいくつかの蛋白質分解系酵素群の作用により生産されるものと推定されている(Yamamoto, 2011)。まず、菌体外プロテイナーゼによって乳蛋白質が分解されオリゴペプチドとなり、それをペプチドトランスポーターで菌体内に取り込み、菌体内でいくつかのペプチダーゼによりアミノ酸や VPP、IPP といったペプチドに加工されると推定される(図 2.1)。菌体外プロテイナーゼ活性の欠損した *L. helveticus* 株を用いた比較検討により、VPP、IPP の生産における菌体外プロテイナーゼの重要性が示された(Yamamoto *et al.*, 1994b)。加えて、カルボキシペプチダーゼの報告のない *L. helveticus* 種において、一部のエンドペプチダーゼが VPP と IPP の C 末端の加工に重要な働きをすることが、*L. helveticus* CM4 株から単離したペプチダーゼの研究により示唆されている(Ueno *et al.*, 2004)。しかしながら、*L. helveticus* CM4 株の蛋白質分解酵素群の全体的な理解、および VPP と IPP の切り出しに関わるその他酵素の関与は不明である。

近年、多くの種の乳酸桿菌の全ゲノム配列が報告されているが、*L. helveticus* 種の全ゲノム配列の報告例は限られており、最初に *L. helveticus* DPC4571 株の全ゲノム配列が決定された。*L. helveticus* DPC4571 株はスイスチーズから単離され、溶菌が早く、苦味ペプチドを軽減し、風味を向上させることが特徴的な株として報告された(Hannon *et al.*, 2003; Hickey *et al.*, 2007; Kiernan *et al.*, 2000)。*L. helveticus* DPC4571 株のゲノムには 24 種の菌体内ペプチダーゼと 1 種類の菌体外プロテイナーゼの存在が推定されている(Callanan *et al.*, 2008)、血圧降下ペプチドの生産性やその加工生産に関連する遺伝子群に関しては不明である。

血圧降下ペプチド高産生株である *L. helveticus* CM4 株において、全ゲノム配列、蛋白質分解系の全体的な理解、VPP、IPP の切り出しに関与する蛋白質分解酵素群やその詳細なプロセスはわかっていない。本章では、*L. helveticus* CM4 株の全ゲノム

配列を決定して、DPC4571 株のゲノムと比較し蛋白質分解系遺伝子群を解析することを目的とした。さらに、CM4 株とゲノム解読が行われている DPC4571 株の菌体外プロテイナーゼ活性、VPP と IPP の生産性の比較を通して、その加工生産に関係する重要な蛋白質分解酵素遺伝子の考察を目的とした。

## 2.2. 実験材料および方法

### 2.2.1. 乳酸菌と培地・培養方法

蛋白質分解活性が強く、VPP と IPP の産生量が多い *L. helveticus* CM4 株を、カルピス社の菌株ストックより実験に供した。ゲノム配列が公開されている DPC4571 株については、アイルランド・ヨーク大学 Paul Ross 教授の御好意により分与を受け、実験に供した。染色体 DNA の抽出のため、CM4 株を 2L の MRS 培地 (Difco Laboratories) で 16 時間静置培養し、15,000 x g で 10 分間遠心分離を行い集菌した。その後、100ml のリン酸バッファー(PBS;140mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0)で 2 回洗浄した。*Escherichia coli* HB101 株(タカラバイオ)を、*L. helveticus* CM4 株の染色体 DNA のショットガンクローニングの宿主として使用した。

### 2.2.2. *L. helveticus* CM4 株の染色体 DNA 断片のクローニング

一般的な DNA 実験は Molecular cloning(Sambrook *et al.*, 1989)に従った。*L. helveticus* CM4 株からの染色体 DNA 抽出は、Leenhouts らの方法(Leenhouts *et al.*, 1990)に従った。抽出した染色体 DNA をガラスシリンジを通過させて断片化した染色体 DNA を 1%アガロースゲルで電気泳動し、約 2kb と約 5kb のバンドを抽出し、約 2kb と約 5kb の染色体 DNA 断片混合物を、プラスミド pUC18 ベクター(タカラバイオ)の *HincII* サイトに挿入した。得られたプラスミドを *E. coli* HB101 株に形質転換し、挿入断片の配列決定に使用した。

### 2.2.3. DNA 配列決定と遺伝子アノテーション

pUC18 プラスミドに挿入した染色体 DNA 断片を pUC18 特異的プライマーを使用し、ダイナミック ET ターミネーター法とビッグダイターミネーター法を用い、3730x1 および 3700DNA Analyzer(アプライドバイオシステムズ)、および、MegaBace 4000 および MegaBase 1000 DNA Analysis System を使用して配列決定



を行った。解読した DNA 断片配列を phred/pharap/consed software を用いてアセンブルした。全ゲノム配列決定後、Glimmer2 ソフトウェアと BLASTP を使用して遺伝子アノテーションを行った。公開されている遺伝子配列は、DDBJ の Amino Acid Sequence Database release 54.0 から入手し、比較解析に使用した。

#### 2.2.4. 菌体外プロティナーゼ活性測定

*L. helveticus* CM4 株および DPC4571 株をそれぞれ 9%(w/w)脱脂粉乳で 37°C 24 時間培養し、培養開始後 1.5, 3, 6, 9 と 12 時間に経時的にサンプリングした。採取した発酵乳を 5N の NaOH で中和し、クエン酸三ナトリウムを終濃度で 2%(w/v)添加して、乳蛋白質を可溶化した。可溶化した発酵乳を 20,000 x g で 10 分遠心分離して菌体を集菌し、50mM グリセロリン酸二ナトリウム溶液(pH8.0)で洗浄した。菌体を PBS で OD=1.0 に調製し、菌体外プロティナーゼ活性測定に用いた。菌対外プロティナーゼ活性は、Yamamoto らの方法(Yamamoto *et al.*, 1993)に従い、Fluorescein isothiocyanated casein (FITC-casein)(シグマアルドリッヒ)を基質として使用して測定した。100  $\mu$  L の 0.2%(w/v)FITC-casein と 100  $\mu$  L の菌体サンプルを混ぜ 42°C で 1 時間酵素反応させた。100  $\mu$  L の 10%(w/w)トリクロロ酢酸(TCA)を加えて未反応のカゼインを遠心分離で除去し、上清に存在するペプチドを回収した。50  $\mu$  L の上清に 150  $\mu$  L の 1M Tris-HCl (pH 8.5)を加え中和し、マイクロプレートリーダー；POWERSCAN HT(大日本製薬)を用いて、495nm の励起波長による 525nm の蛍光波長を測定した。未反応の FITC-casein の TCA 可溶性画分の蛍光強度を 0%、TCA の代わりに蒸留水を添加し FITC-casein を沈殿させない場合の蛍光強度を 100%として、サンプル添加時の蛍光強度の割合(%)を算出した。活性ユニットは、上記反応条件での TCA 可溶性画分の蛍光強度の割合が 1%であるときのプロティナーゼ活性を 1 ユニット(1U)と定義した。

#### 2.2.5. 発酵乳中の VPP および IPP の定量

VPP、IPP の定量は Inoue らの方法(Inoue *et al.*, 2009)に従った。High performance liquid chromatography-electro-spray ionization multiple reaction monitoring tandem –quadrupole mass spectrometry (LC-ESI-MRM-MS/MS)システムを用いて、陽イオン化モードで測定を行った。同位体 Val(<sup>13</sup>C<sub>5</sub>)-Pro(<sup>13</sup>C<sub>5</sub>)-Pro (m/z 324.2)と Ile- Pro(<sup>13</sup>C<sub>5</sub>)-Pro (m/z 332.2) (スクラム)をそれぞれ VPP と IPP の内部標準

物質として発酵乳サンプルに添加して内部標準法で測定を行った。C-18 タイプ逆相カラム ; ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters)を 55°Cに保温し、溶液 A(0.1%ギ酸水溶液)と溶液 B(0.1%ギ酸含有エタノール)を用い、溶液 A : 溶液 B=97:3 から 90.5:9.5 まで 12 分間の直線濃度勾配によるグラジエントをかけて 0.5mL/分の流速で溶出した。スタンダードは 0-480ng/mL、内部標準は 150ng/mL で使用した。3 回の実験を行い、Student's *t*test で統計解析を行った。

#### 2.2.6. $\beta$ カゼイン分解物のペプチド解析

菌体外プロテイナーゼの特異性を比較評価するため、*L. helveticus* CM4 株および DPC4571 株を 9%(w/w)脱脂粉乳で、5N 水酸化ナトリウムを添加しながら pH6.5 に保ち、37°Cで培養した。培養 3 時間後にクエン酸三ナトリウムを添加し(終濃度 1%(w/v))、乳培地を可溶化し、それぞれの菌体を PBS で 2 度洗浄した。洗浄した菌体を酵素液として用い、1,000U の酵素液と 10mMTris-HCl に溶解した 100mg の  $\beta$  カゼインを混合し、37°Cで 1 時間インキュベートした。2 種の乳酸菌菌体で調製した  $\beta$  カゼイン分解物を、分子量 5,000 カットのフィルターに通し、LC-MS/MS 解析に供した。ペプチドサンプルを Ohsawa らの方法(Ohsawa *et al.*, 2008)に従い、LCMS-IT-TOF 法で分析を行った。Atlantis T3 カラム(WATERS)を 50°Cに保温し、溶液 A(0.1%ギ酸水溶液)から溶液 B(0.1%ギ酸含有 40%アセトニトリル溶液)/60 分間の直線濃度勾配グラジエントをかけて、200  $\mu$  L/分の流速で溶出した。

#### 2.2.7. ウェスタンブロッティング

菌体外プロテイナーゼのウェスタンブロッティング解析は Towbin らの方法に従った(Towbin *et al.*, 1979)。まず、SDS-PAGE を 5-15%グラジエントポリアクリルアミドゲルを用いて Laemmli らの方法に従って(Laemmli, 1970)行った。Pre-stained SDS-PAGE standard proteins (Bio-Rad)をマーカー蛋白質として使用した。電気泳動後、ゲル内の蛋白質をニトロセルロース膜 (Millipore)に転写し、CP790 の菌体外プロテイナーゼ PrtY に対するマウス抗体(Yamamoto *et al.*, 1995)を用いて検出し、ビオチン化抗マウス IgG 抗体、アビジン-ペルオキシダーゼを用いて発色させた。

### 2.3. 結果

#### 2.3.1. ゲノム配列解析

*L. helveticus* CM4 株の全ゲノム配列については、約 2k, 5k のゲノム DNA 断片を pUC18 ベクターの *HincII* サイトに挿入して作製したプラスミドライブラリーをベースに各挿入断片の配列解析を実施した。ゲノム配列解析を平均冗長度 8.3 で解読した結果、全ゲノムサイズ 2,028,492bp、GC 含量 37.05%であった。プロファージ遺伝子およびプラスミド DNA は検出されなかった。2,174 の推定オープンリーディングフレーム(ORF)と 64 の tRNA と 5 つの rRNA オペロンが検出された(図 2.2)。GC スキューおよび推定複製開始点(Ori)を図 2.2 の物理地図に示した。推定 ORF を、Cluster of Orthologous Group (COG)データベースを用いて、分類を行った。2,174 の推定 ORF のうち、790 の ORF が分類(アノテーション)された。そのうち 41%は Metabolism、30%は Information storage and processing、8%は Cellular processing and Signaling に分類され、21%は no clear function であった(データ未掲載)。Metabolism に分類されたグループには、蛋白質分解システム、アミノ酸の輸送・代謝、炭水化物の輸送・代謝、核酸の輸送・代謝、補酵素の輸送・代謝、エネルギー産生・変換、脂質輸送・代謝、無機物質の輸送・代謝が含まれた。Information storage and processing に分類されたグループには、遺伝子複製・修正・転写・翻訳が含まれた。Cellular processing and Signaling に分類されたグループには、転写後修飾、シグナル伝達、細胞内移動・分泌、細胞壁・膜合成、翻訳後修飾、細胞周期制御、防御機構が含まれた。

### 2.3.2. 既存乳酸菌遺伝子群との相同性解析

現在までに、36 株以上の *Lactobacillus* 属乳酸菌の全ゲノム配列が解析されている。*L. helveticus* 種で全ゲノム配列の報告がある DPC4571 株(Callanan *et al.*, 2008) の全遺伝子配列と CM4 株の全遺伝子の相同性解析を行った。BLAST-P 解析を用いて、CM4 株のそれぞれの遺伝子と DPC4571 株の中で最も相同性の高い遺伝子を探索し、その遺伝子の両株でのゲノム上の位置をプロットした(図 2.3)。図 2.3 に示すように相同遺伝子群の染色体上のそれぞれの位置は両株でよく類似していた。CM4 株と DPC4571 株の遺伝子間の相同性の平均値は、85.5%であった。図 2.3 に示すように、遺伝子の並びが保存されたまま逆向きになった部分があることから、大規模な転座が CM4 株もしくは DPC4571 株に起こった可能性が示された。次に、*L. helveticus* 種と相同性が高いと報告のある *Lactobacillus acidophilus* 種においてゲノム配列の報告がある NCFM 株との比較を行い、それぞれの相同遺伝子のゲノム上の位置をプロッ

トした。その結果、DPC4571 株とのプロット図と同様に相同遺伝子の並びはよく保存されており、転座と考えられる部分も確認できた(図 2.3B)。*L. helveticus* DPC4571 株と *L. acidophilus* NCFM 株での遺伝子の並びは非常に似ているのに対し(Callanan *et al.*, 2008)、どちらの菌株と比べても *L. helveticus* CM4 株で大規模な転座が確認できたことから、CM4 株に特徴的なゲノムの転座である可能性が推察された。

### 2.3.3. 蛋白質分解酵素遺伝子群の比較

CM4 株ゲノムの遺伝子アノテーションの結果、2 種類の菌体外プロティナーゼに対応する遺伝子 *prtY*, *prtH2* と 1 つのプロティナーゼ活性化蛋白質に対応する遺伝子 *prtM2* と 26 種類の菌体内ペプチダーゼ遺伝子が検出された(表 2.1)。菌体内ペプチダーゼ遺伝子の比較においては、CM4 株で確認された 26 種類の遺伝子が DPC4571 株でもすべて確認され、そのすべてが高い相同性を示した(98.5~100%)。従って、CM4 株と DPC4571 株の菌体内のペプチダーゼに関しては、遺伝子配列レベルでの特徴的な差が少ないものと考えられた。菌体外プロティナーゼの比較では、*prtH2* 遺伝子は両株から検出されたが(Callanan *et al.*, 2008)、DPC4571 株においては偽遺伝子とアノテーションされており、*prtH2* 遺伝子の途中でナンセンスコドンが挿入され、もともとは 1656 アミノ酸からなる蛋白質が 1285 番目のアミノ酸で蛋白質の翻訳が停止することが推定された。PrtH2 プロティナーゼ活性化因子と考えられる *prtM2* 遺伝子は両株で確認され、相同性も 98.0% で高かった。一方、CM4 株で確認されたもう 1 つの菌体外プロティナーゼ *prtY* 遺伝子は、DPC4571 株には存在しなかった。PrtY は *L. helveticus* CP790 株で 45kDa の細胞壁結合プロティナーゼとして報告されている(Yamamoto *et al.*, 1993)。一方、*L. helveticus* CNRZ32 株で報告のある菌体外プロティナーゼ遺伝子 *prtH*, *prtH3*, *prtH4* およびプロティナーゼ活性化因子 *prtM* の遺伝子(Broadbent *et al.*, 2011)は、CM4 株にも DPC4571 株にも存在しなかった。これらの結果から、CM4 株と DPC4571 株の蛋白質分解酵素遺伝子の中で、培地中の蛋白質を最初に分解する菌体外プロティナーゼ遺伝子が異なることが示された。

### 2.3.4. 菌体外プロティナーゼのウエスタンブロッティング

CM4 株と DPC4571 株の比較ゲノムの解析から示唆された菌体外プロティナーゼの違いをさらに CM4 株と DPC4571 株間で確認するため、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロティナーゼ PrtY に対する抗体(Yamamoto *et al.*, 1995)を用いてウエス

タンブロット解析を行い、PrtY の相同蛋白質の検出を行った。図 2.4 に示すように、CM4 株の細胞抽出物からのみ 45kDa の PrtY と考えられるバンドが検出され、DPC4571 株からは検出されなかった。

### 2.3.5. 菌体外プロテイナーゼ活性と血圧降下ペプチド産生量の比較

CM4 株と DPC4571 株の菌体外プロテイナーゼの性質の違いをより詳細に理解するため、両株の菌体外プロテイナーゼ活性を測定した。乳培地中で培養した際の両株の菌体外プロテイナーゼ活性は、培養開始 3 時間後まで上昇し、その後低下した(図 2.5)。CM4 株の菌体外プロテイナーゼ活性は、培養開始 1.5、3、6 時間後で DPC4571 株よりも高かった。特に、CM4 株のプロテイナーゼ活性は、培養開始 3 時間後で最も高く、DPC4571 株の約 3 倍高かった。

次に蛋白質分解系酵素によって、発酵乳中に生産される血圧降下ペプチド；VPP と IPP の産生量を両株で比較した。それぞれの株を 9%(w/w)脱脂粉乳で 37°C で培養し、発酵乳中の VPP、IPP 量を LC-MS/MS を用いて定量した。VPP、IPP 産生量は、発酵開始とともに増加し、培養開始 12 時間後に定常値に達した。CM4 株発酵乳中の VPP、IPP 量は DPC4571 株に比べ、培養中常に多かった(図 2.5B)。しかし、VPP と IPP の産生量の比(VPP/IPP)は、CM4 株で 1.52~1.60、DPC4571 株で 1.70~1.79 で大きな違いはなかった。これらの結果から、CM4 株では菌体外プロテイナーゼ活性が高いことにより乳蛋白質の VPP と IPP を含む前駆ペプチドの生産量が増加することで最終的に血圧降下ペプチド、VPP と IPP の産生量が増加する可能性が考えられた。加えて、VPP/IPP 比に 2 株間で大きな差がなかったことから、その後の前駆ペプチドの菌体内ペプチダーゼによる加工には 2 株間で大きな差がない可能性が推察された。

### 2.3.6. 菌体外プロテイナーゼによるカゼイン分解物の比較

CM4 株と DPC4571 株の菌体外プロテイナーゼのカゼインに対する分解特異性を比較するため、VPP と IPP 配列の供給源である  $\beta$  カゼインを両菌体の表層上のプロテイナーゼによって分解した分解物を LCMS-IT-TOF を用いて比較分析した。2 株の分解による  $\beta$  カゼイン分解物は極めて類似しており(図 2.6)、検出されたペプチドピークの中で、70 以上の主要なペプチドで CM4 株および DPC4571 で同様に検出された(データ未掲載)。一方、いくつかのペプチドでピーク強度の違いが確認された(図

2.6)。VPP と IPP の配列を含むオリゴペプチドである 71-PQNIPPLTQTPVVPPFLQPE-91 のピーク強度は、CM4 株の分解物で強かった。さらに、いくつかのピーク強度は 2 株の  $\beta$  カゼイン分解物間で差が認められた。① 184-DMPIQA-189, ② 114-YPVEPF-119, ③ 195-EPVLGPVRGPPF-206, ④ 109-MPFPKYPVEPF-119, ⑤ 108-EMPFPKYPVEPF-119, ⑥ 128-TDVENLHLPLPL-139, ⑦ 194-QEPVLGPVRGPFPIIV-209, ⑧ 129-DVENLHLPLPL-139、の 8 つのペプチドのピーク強度は 2 株間で違いが確認された。特に④、⑤、⑦のピークは CM4 株の  $\beta$  カゼイン分解物で DPC4571 株に比べ強かった(図 2.6)。いくつかのペプチドのピーク強度は、2 株間で差があったものの、両株の菌体外プロテイナーゼの切断点に顕著な違いは確認されなかった。 $\beta$  カゼインの切断点に両株間で大きな違いはなく、プロテイナーゼ活性は血圧降下ペプチドを多く産生する CM4 株で高かったことから、活性強度の違いが血圧降下ペプチド (VPP, IPP) の生産性に影響を与えているものと推定された。

## 2.4. 考察

本章の検討によって、菌体外プロテイナーゼ活性が高く血圧降下ペプチド高産生株である *L. helveticus* CM4 株の全ゲノム配列を明らかとし、蛋白質分解系遺伝子群を特定した。蛋白質分解系遺伝子群の特定によって、血圧降下ペプチド産生に必要と推定されていたペプチダーゼ群の遺伝子が *L. helveticus* CM4 株に存在することが明らかとなった。また、DPC4571 株と比較することによって、遺伝子配列レベルでは両株の菌体内ペプチダーゼ遺伝子群の相同性は高いが、菌体外プロテイナーゼ遺伝子には違いが確認された。さらに、両株の菌体外プロテイナーゼ活性および血圧降下ペプチド産生量を比較することによって、あらためて血圧降下ペプチド産生における菌体外プロテイナーゼ活性の重要性が示された。

*L. helveticus* 種にはいくつかの異なった菌体外プロテイナーゼ分子種の報告があるが(Genay *et al.*, 2009)、我々の過去の研究からも、*L. helveticus* 種の菌体外プロテイナーゼは、ウエスタンブロッティング解析により、約 45kDa の PrtY タイプと約 170kDa の高分子タイプの 2 つに分類できることが明らかとなっている(Ono *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998)。また、*L. helveticus* CNRZ32 株には *prtH*, *prtH2*, *prtH3*, *prtH4* の 4 種の遺伝子が存在し、そのうち 1~4 種の遺伝子を持つ *L. helveticus* 菌株が報告されている。本検討において CM4 株のゲノム配列解析により、

*L. helveticus* CP790株で蛋白質分解活性が確認された菌体外プロテイナーゼ PrtYの遺伝子(Yamamoto *et al.*, 1993)が、CM4株ゲノムに存在することが明らかとなった。CM4株の *prtY* 遺伝子は CP790株の遺伝子と 99.6%の高い相同性を示したが、DPC4571株ゲノムには存在していなかった。両株のゲノムに存在した *prtH2* 遺伝子は、CM4株では CNRZ32株で報告されている *prtH3* とアミノ酸レベルで 98%の同一性であった(Broadbent *et al.*, 2011)。一方で DPC4571株の *prtH2* 遺伝子は偽遺伝子とアノテーションされている。DPC4571株の *prtH2* 遺伝子では途中でナンセンスコドンが挿入され、もともとは 1656 アミノ酸の蛋白質が 1285 アミノ酸の蛋白質で翻訳が停止する遺伝子となっていた。PrtH2を含む細胞壁結合プロテイナーゼの触媒ドメインはN末端に存在するため(Sadat-Mekmene *et al.*, 2011)、DPC4571株の偽遺伝子とアノテートされた *prtH2* 産物がプロテイナーゼ活性をもつ可能性も考えられる。実際に DPC4571株はプロテイナーゼ活性を保有し、乳中で生育できることを確認している(図 2.5)。しかし、断片化された *prtH2* 産物の C 末端には細胞壁結合に重要と考えられるドメインが含まれないため、本試験に供した洗浄菌体にプロテイナーゼ活性が保持されていたこと(図 2.5)をふまえると、断片化された *prtH2* 産物以外にも、未知の菌体外プロテイナーゼが存在し、活性に影響している可能性も残される。DPC4571株の活性をもつプロテイナーゼが、ストップコドンにより断片化された PrtH2なのか、それともまだ報告のないプロテイナーゼかは不明のままであり、今後の検討が必要である。一方で、CM4株は、活性があると考えられるプロテイナーゼの遺伝子が 2 つ存在していることが明らかとなり、DPC4571株と比べて高いプロテイナーゼ活性を保持する要因として、PrtH2に加えて PrtYが発現することによって相加的にプロテイナーゼ活性が高くなったことも推察できるが、解明には PrtH2、および PrtYのプロテイナーゼの分子種ごとの活性、発現量などの解析が必要である。

*L. helveticus* CM4株と DPC4571株の株間での血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の産生量と菌体外プロテイナーゼ活性の違いの原因を探索するため、細胞壁結合プロテイナーゼにより分解したβカゼイン分解物の比較を行った。分解物から検出された多くのペプチドとピーク強度は、2株間で大きな差はなかった(図 2.6)。加えて、VPPとIPPの配列を含むオリゴペプチドである 71-PQNIPPLTQTPVVPPFLQPE-91は、両株のβカゼイン分解物から検出された。このように、両株の菌体外プロテイナーゼの切断点はほぼ同様であり、血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の産生量の違いの原因は菌体外プロテイナーゼの切断点の違いによるものではないと考えられた。過去の CP790

菌体外プロテナーゼを用いたカゼイン切断点の解析により、本酵素はカゼインのアミノ酸配列を認識して切断するというよりも、カゼインの高次構造を認識して切断している可能性が示唆されている(Yamamoto *et al.*, 1993)。以上のことより、CM4 株における血圧降下ペプチドの高生産にとって重要な要因は、菌体外プロテナーゼによるカゼインの切断特異性ではなく、プロテナーゼ活性の強弱であると考えられた。菌体外プロテナーゼは非活性型で細胞外に輸送され、活性化因子によって活性化されて初めてプロテナーゼ活性を有すると考えられている(Yamamoto *et al.*, 1995)。そのため、CM4 株の高い菌体外プロテナーゼ活性のより詳細な理解には、各分子種ごとの活性の確認に加え、プロテナーゼの活性化因子とメカニズムや、それらの遺伝子の転写調節の解明が必要となるだろう。

蛋白質分解酵素遺伝子群の比較解析を行ったところ、26 種類の菌体内ペプチダーゼ遺伝子はその上流領域配列を含めて 2 株間で高い相同性を示した(データ未掲載)が、菌体外プロテナーゼに関しては両株間で上述のような違いが確認された。これらのことから少なくとも遺伝子配列レベルでは、菌体内のペプチダーゼは菌株間での相違が少なく、菌体外のプロテナーゼに大きな違いがあることが明らかになった。このプロテナーゼの違いが、血圧降下ペプチド VPP と IPP の生産性の違いの要因である可能性が考えられた。

一方、ペプチダーゼ遺伝子配列に関しては両株で大きな違いが無かったものの菌体内で前駆ペプチドから VPP と IPP への加工に必須と考えられる、エンドペプチダーゼ、アミノペプチダーゼなどの存在が明らかとなった。即ち、カルボキシルペプチダーゼの乳酸菌における報告が無いように、CM4 株でもそれらの遺伝子は確認されなかったことから、VPP と IPP の C 末端の加工には PepE, PepE2, PepF, PepO1, PepO2 あるいは PepO3 などのエンド型ペプチダーゼの関与が必須と考えられる。特に、酵素学的な研究から、エンドペプチダーゼ PepO1 と PepO2 と PepO3 が、前駆ペプチドから VPP、IPP のカルボキシル末端の加工での重要性が示されている(Ueno *et al.*, 2004)。また、アミノ末端の加工においては、前駆ペプチドからの X-Pro 配列の除去において XPDAP の重要性が考えられる(Vesanto *et al.*, 1995)。また、XPDAP との組み合わせによる N 末端からのアミノ酸の除去が必要であり PepC2, PepN, PepN2, PepCE, PepM などの重要性が考えられる。

該当する酵素活性が期待できる酵素群として、表 2.1 に示すようにいくつかの候補酵素が存在するが、今後、前駆ペプチドに候補ペプチダーゼを反応させて VPP あ



るいは IPP の生産性を評価する方法や遺伝子欠損株による発酵乳内の生産性の評価による、より詳細な解析を進める必要がある。また一方で、発酵乳中でのアミノ酸やペプチドの蓄積による菌体外プロテイナーゼの著しい活性の低下が報告されている (Genay *et al.*, 2009; Smeianov *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 1995; Yamamoto & Takano, 1997)。この菌体外プロテイナーゼの活性低下は *L. helveticus* 発酵乳中での血圧降下ペプチドの産生低下につながる。血圧降下ペプチド産生強化や乳酸菌の育種改良のためには、蛋白質分解酵素の調節機構の解明が今後必要である。

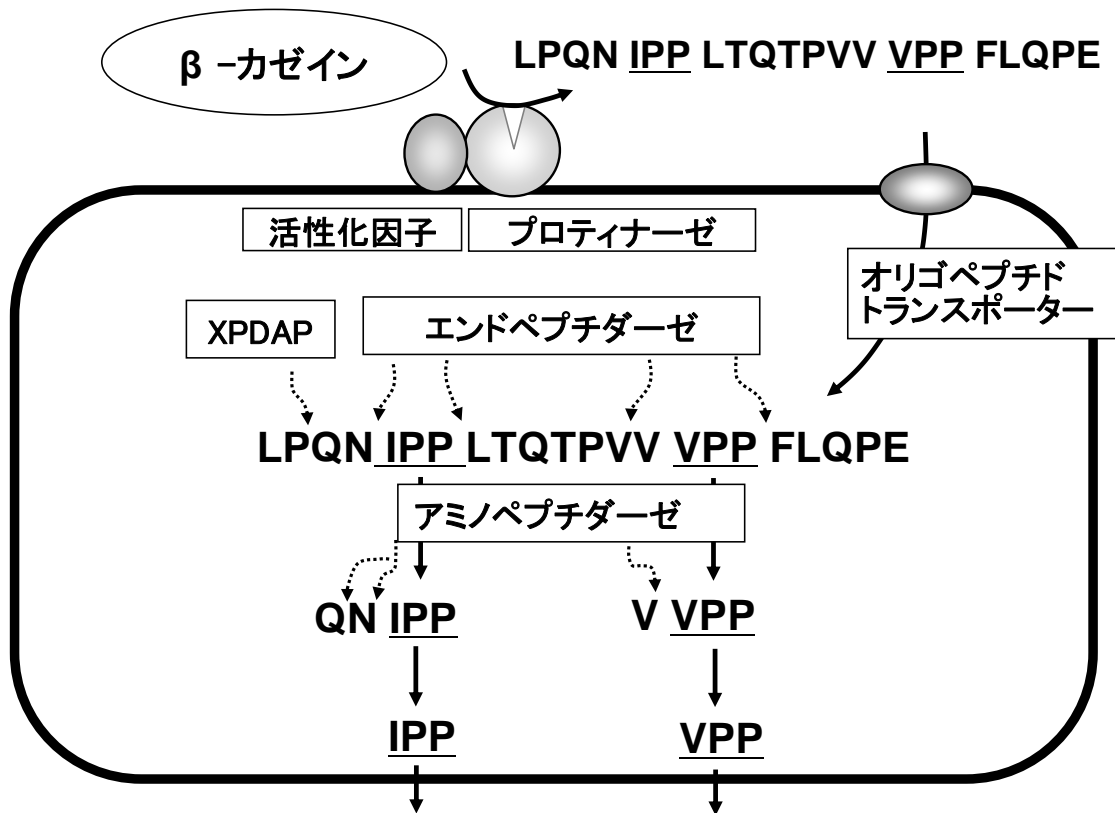


図2.1 CM4株における血圧降下ペプチドVPP、IPPの加工に関する蛋白質分解系の推定 乳中のβ-カゼインは菌体外プロテイナーゼによって分解され、オリゴペプチドとなる。オリゴペプチドはトランスポーターによって取り込まれ、菌体内のペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解される。その過程で分解されにくい配列としてIPP、VPPが産生される。VPP、IPP配列には下線を記した。実線矢印は蛋白質の分解の流れを示し、点線矢印は各酵素群の切断点を示した。オリゴペプチド配列は発酵乳中から検出された配列を記載した。

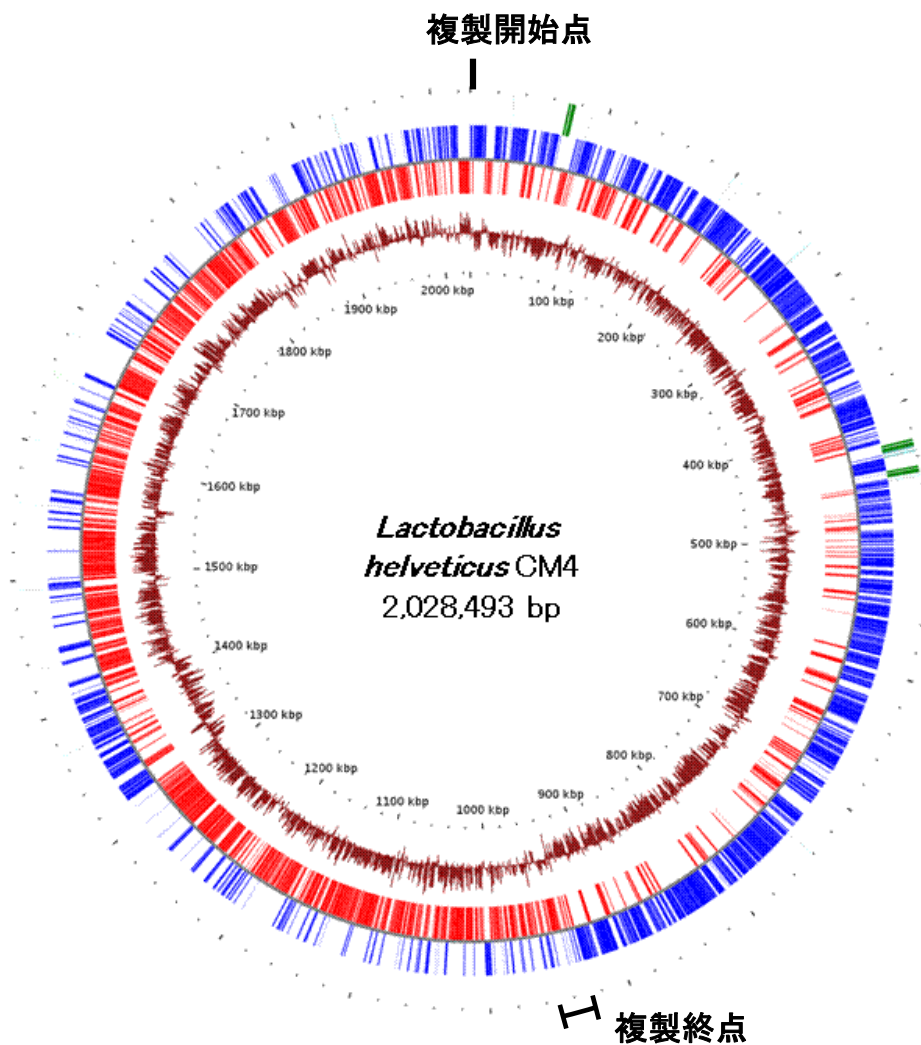
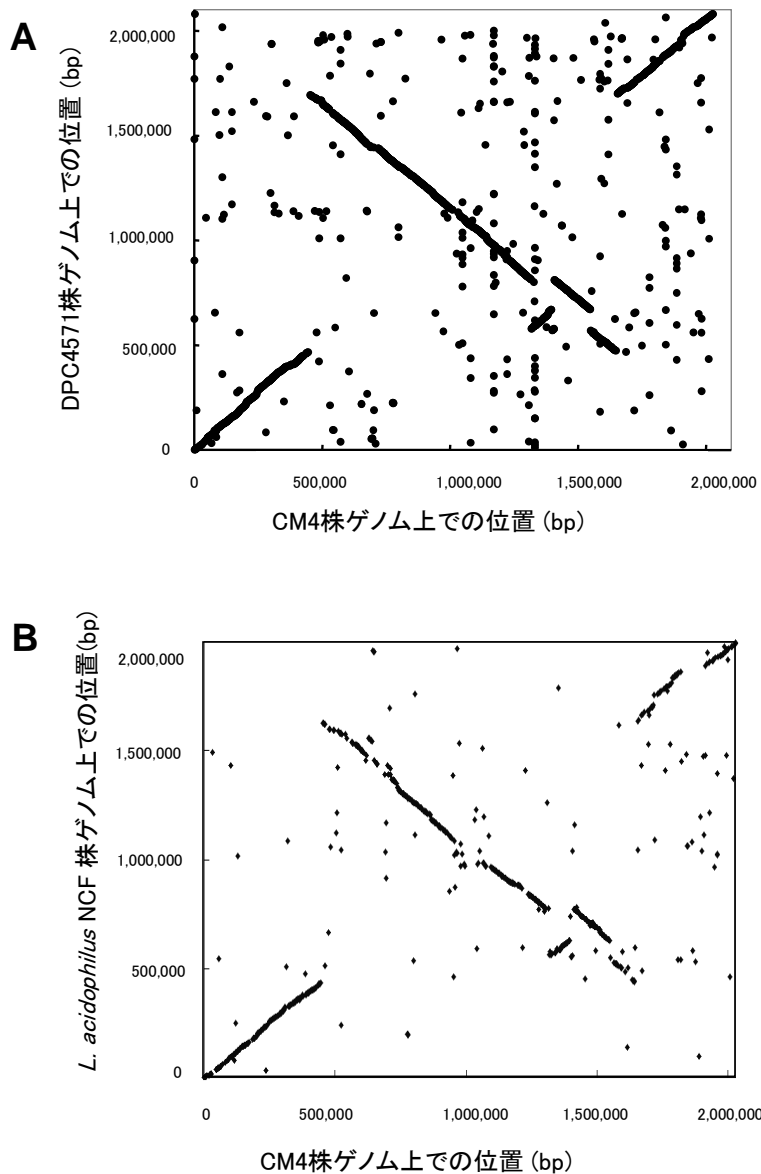


図 2.2 *L. helveticus* CM4株のゲノム物理地図 円の外側からtRNAを水色、rRNAを緑、オープンリーディングフレーム(ORF)は+鎖を青、-鎖を赤、GCスキューを茶色で示す。内側に複製開始点からの距離(kbp)を示す。



**図 2.3** *L. helveticus* CM4株と*L. helveticus* DPC4571株または*L. acidophilus* NCFM株のゲノム上の遺伝子位置の比較 (A) *L. helveticus* CM4株と*L. helveticus* DPC4571株の比較。(B) *L. helveticus* CM4株と*L. acidophilus* NCFM株との比較。点は相同性が高いORFの各ゲノム上での位置を示す。

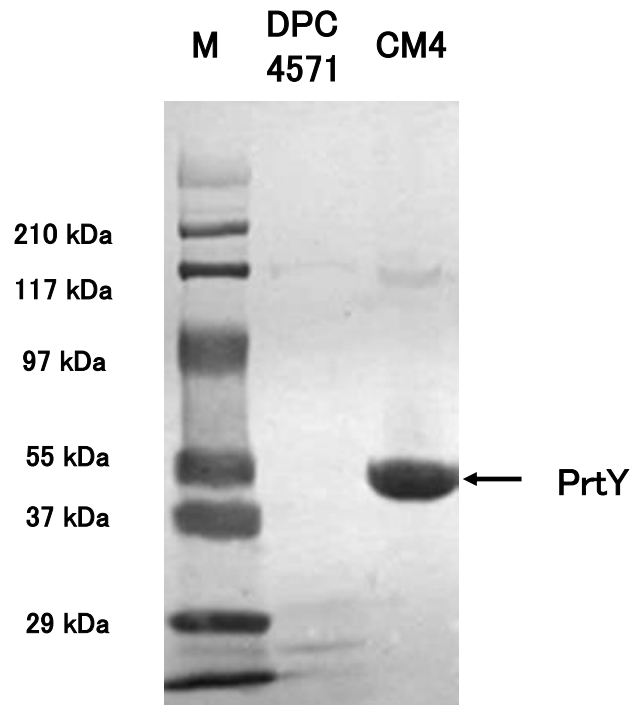
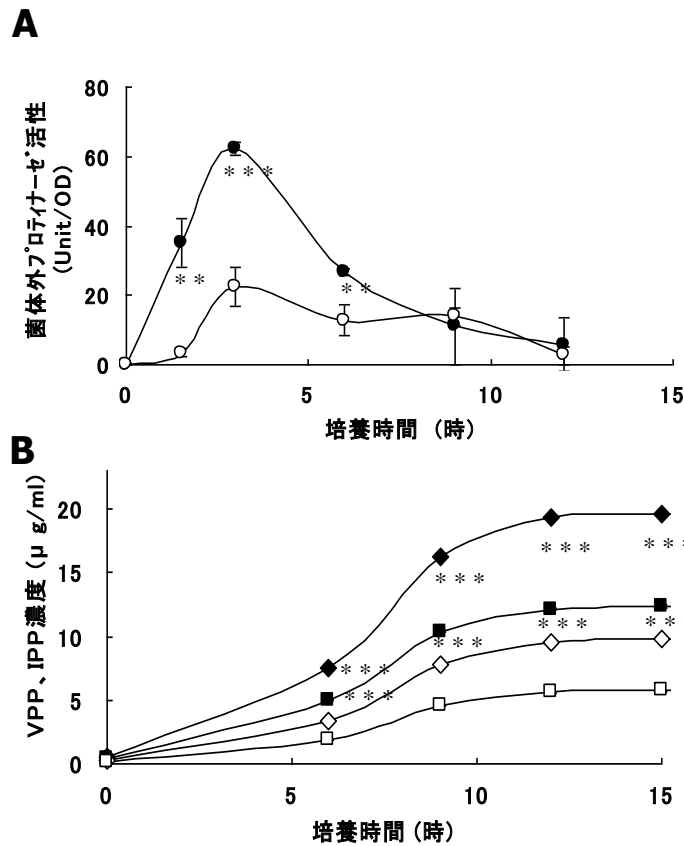
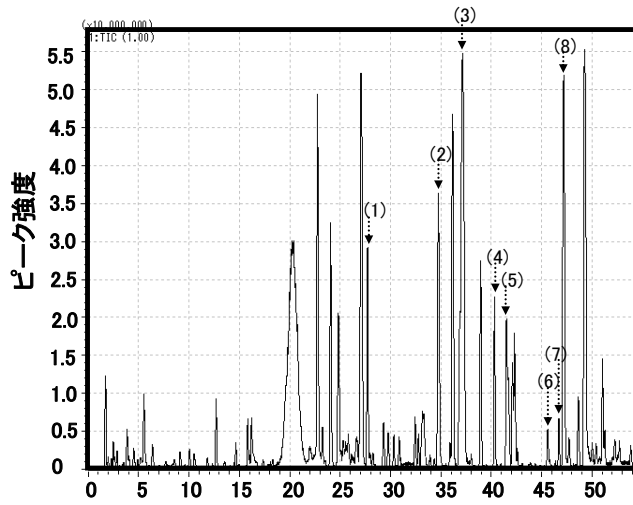


図 2.4 抗PrtY抗体を用いた*L. helveticus* CM4株とDPC4571株菌体抽出物のウエスタンブロッティング解析 CM4株またはDPC4571株を超音波破碎して、5-15%SDS-PAGEによる電気泳動後、抗PrtY抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。DPC4571: *L. helveticus* DPC4571株細胞抽出物、CM4: *L. helveticus* CM4株細胞抽出物、M: 分子量マーカー



**図 2.5 菌体外プロテイナーゼ活性(A)と血圧降下ペプチド産生量(B)の比較**  
 (A) 9%(w/w)脱脂粉乳で37°C培養中の菌体外プロテイナーゼ活性。プロテイナーゼ活性は菌体懸濁液を酵素液として、FITC-カゼインを基質として42°C1時間反応させて測定した。*L. helveticus* CM4株: ●、*L. helveticus* DPC4571株: ○、(B) 同発酵乳中の血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生量。VPP, IPPはLC-MSMSを用いて測定した。CM4株のVPP(◆)、IPP(■)、DPC4571株のVPP(◇)、IPP(□)、\*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$ (student's *t*-test)

## CM4



ピーク強度が異なる配列

(No) 配列

- (1) 184-DMPIQA-189
- (2) 114-YPVEPF-119
- (3) 195-EPV LGPVRGPFP-206
- (4) 109-MPFPKYPVEPF-119
- (5) 108-EMPFPKYPVEPF-119
- (6) 128-TDVENLHLPL-139
- (7) 194-QEPV LGPVRGPFP IIV-209
- (8) 129-DVENLHLPL-139

## DPC4571

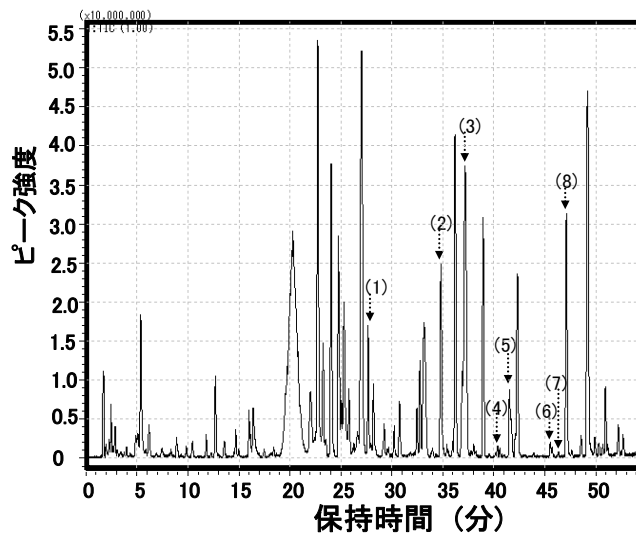


図 2.6 *L. helveticus* CM4株とDPC4571株の菌体外プロテナーゼによる $\beta$ カゼイン分解物の比較 菌体懸濁液を酵素液として $\beta$ カゼインと混合し37°Cで1時間反応させた。 $\beta$ カゼイン分解物はLC-MS/MSで分析し、両株の分解物中で異なるピーク強度の配列を右に示した。

表 2.1 *L. helveticus* CM4株とDPC4571株の蛋白質分解系遺伝子の比較

酵素の局在	蛋白質分解酵素	遺伝子	相同性 (identity)(%)	分子量(kDa)		ゲノム上の位置 <sup>a</sup>	遺伝子の <sup>b</sup> 向き	ORF ID	蛋白質ID
				CM4	DPC4571			CM4	DPC4571
細胞外	プロテイナーゼ	<i>prtY</i>	-	47.0	ND	175,514	+	x05301 01612	ND
		<i>prtH2</i>	77.3	181.6	139.4 <sup>c</sup>	533,072	+	x05301 01219	( <i>lhv_1641</i> ) <sup>d</sup>
	プロテイナーゼ活性化因子	<i>prtM2</i>	98.0	33.7	32.7	521,362	-	x05301 01238	ABX27563
細胞内	アミノペプチダーゼ	<i>pepG2</i>	98.9	51.4	51.4	320,836	-	x05301 01453	ABX26582
		<i>pepN</i>	99.4	95.8	95.9	1,818,216	-	x05301 02039	ABX27731
		<i>pepN2</i>	100.0	57.2	57.2	543,957	-	x05301 01212	ABX27544
		<i>pepCE</i>	98.6	53.0	50.2	1,181,103	-	x05301 00536	ABX27065
		<i>pepM</i>	99.6	30.9	30.8	1,373,688	+	x05301 00322	ABX26809
		<i>aminopeptidase I zinc metalloprotease</i>	99.4	40.1	40.1	1,401,650	+	x05301 00297	ABX26758
	XPdap	<i>pepX</i>	99.6	90.5	90.6	737,417	-	x05301 00997	ABX27419
	エンドペプチダーゼ	<i>pepE</i>	99.8	50.0	50.0	204,264	-	x05301 01585	ABX26466
		<i>pepE2</i>	99.8	50.3	50.3	199,668	+	x05301 01588	ABX26457
		<i>pepF</i>	99.0	68.1	68.1	1,767,646	+	x05301 02091	ABX27686
		<i>pepO1</i>	99.4	73.6	73.5	809,311	+	x05301 00924	ABX27358
		<i>pepO2</i>	98.6	73.8	73.5	997,656	+	x05301 00724	ABX27211
		<i>pepO3</i>	99.7	73.1	72.6	168,375	+	x05301 01619	ABX26433
	トリペプチダーゼ	<i>pepT</i>	99.3	47.1	46.7	882,757	+	x05301 00852	ABX27305
		<i>pepT2</i>	99.5	48.4	48.4	1,061,369	-	x05301 00661	ABX27165
	ジペプチダーゼ	<i>pepD2</i>	99.8	54.9	54.9	788,870	+	x05301 00946	ABX27375
		<i>pepD3</i>	99.4	54.0	54.1	1,674,949	-	x05301 00007	ABX27625
		<i>pepD4</i>	100.0	53.5	53.5	1,804,672	+	x05301 02052	ABX27723
		<i>pepD3t</i>	95.7	34.8	38.3	39,901	+	x05301 01758	AAV80225
<i>pepV</i>		98.9	51.5	51.5	980,111	+	x05301 00745	ABX27224	
<i>pepDA</i>		99.6	53.5	53.5	235,742	-	x05301 01552	ABX26492	
プロリダーゼ		<i>pepQ(pepP)</i>	99.5	41.2	41.2	417,687	-	x05301 01340	ABX26664
	<i>pepQ2(pepP)</i>	99.7	41.4	41.1	748,424	+	x05301 00984	ABX27405	
プロリナーゼ	<i>pepPN</i>	99.7	35.0	35.0	1,693,861	+	x05301 02166	ABX27633	
プロリンイミノペプチダーゼ	<i>pepI</i>	99.3	33.9	33.8	98,998	-	x05301 01696	ABX26375	
ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ	<i>pcp</i>	98.5	21.8	21.7	189,507	+	x05301 01597	ABX26447	

ND; Not detected.

XPdap: X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase.

a 複製開始点からのスタートコドンの位置

b +: +鎖、 -: -鎖

c ストップコドンの挿入により偽遺伝子と報告がある断片化されたORFの分子量

d 偽遺伝子と登録されているため、ORFのlocus tag number



### 第3章 アミノ酸による *L. helveticus* CM4 株の蛋白質分解系の発現制御解析

#### 3.1. 緒言

第1章に記載のように、一般的に乳酸菌はアミノ酸要求性が高く、乳培地中で生育するためのペプチドやアミノ酸を得るために、乳培地中の蛋白質を分解する蛋白質分解系を保持している(Kok, 1990; Kunji *et al.*, 1996)。しかし、その遺伝子発現が菌体内のアミノ酸濃度に依存して制御されることが *L. lactis* 種を中心に報告されている(Marugg *et al.*, 1995)。すなわち、菌体内のアミノ酸プールがある濃度レベルになると、特定の遺伝子群の発現が抑制されるというものである。

その後、*Lactococcus* 属や *Bacillus* 属、*Streptococcus* 属細菌において、このアミノ酸に応答する転写調節システムが詳細に研究され、転写調節因子として CodY 蛋白質が報告された(Belitsky & Sonenshein, 2008; den Hengst *et al.*, 2005b; Hendriksen *et al.*, 2008)。CodY 蛋白質は、細胞内の分岐鎖アミノ酸(BCAAs; Val、Leu、Ile)と結合し、蛋白質分解系遺伝子の転写調節領域に存在する認識配列(シスエレメント; codY-box)に直接結合することで、蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制する。菌体外プロテイナーゼやペプチダーゼ群、トランスポーターなどの蛋白質分解系遺伝子は、その転写調節領域に codY 結合領域 (codY-box)があり、CodY 蛋白質の結合によって転写が調節されている(Belitsky & Sonenshein, 2008; den Hengst *et al.*, 2005b; Hendriksen *et al.*, 2008)。これらのシステムにより蛋白質分解系の働きで過剰に供給された、培地中のペプチドやアミノ酸に対して、CodY が菌体内の BCAAs を感知して、その供給に重要な蛋白質分解系の働きを抑制するものと考えられている。

一方、*L. helveticus* 種は乳酸菌の中でも最も蛋白質分解活性が強く、その活性の発現制御は発酵乳の製造や機能性ペプチドの生産量にも大きく影響することから、*L. helveticus* 種において特に重要と考えられる。*L. helveticus* 種における菌体外プロテイナーゼ活性は、アミノ酸やペプチドの乳中への蓄積によって抑制されることが報告されている(Yamamoto *et al.*, 1995)。*L. helveticus* 種の菌体外プロテイナーゼ活性は、乳培地中の対数増殖初期で最も高い活性を示すが、アミノ酸やペプチドが豊富な培養後期やペプチドの豊富な MRS 培地などで培養した場合には活性は常に低いことが確認されている。また、合成培地へのカザミノ酸、カジトンなどカゼインの酸加水分解物(アミノ酸や短鎖ペプチド)の添加により、著しい菌体外プロテイナーゼ活

性の低下が報告されている(Hebert *et al.*, 2000)。さらに、我々の研究で菌体外プロティナーゼの活性化過程がペプチド添加により抑制されることで、酵素活性の発現が抑制される事を明らかにしてきた(Yamamoto *et al.*, 1995)。

しかしながら、*L. helveticus* 種においては *Lactococcus* 属におけるアミノ酸に応答する転写調節因子 CodY のような発現調節機構の存在に関しては全く不明である。今後、様々な発酵乳内のペプチドの保健効果の有効利用を考えた場合、その生産強化のためには、蛋白質分解系遺伝子群の発現調節機構の解明が必須である。

本検討では、乳培地へのペプチドやアミノ酸添加による *L. helveticus* CM4 株の蛋白質分解系遺伝子の転写量への影響を解析することを目的とした。転写量解析には、第一章で明らかとなった CM4 株の遺伝子配列情報を活用し、全遺伝子に対応した DNA マイクロアレイを作製し、評価に供した。さらに、そのときの菌体外プロティナーゼ活性と血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生量との関係を調べることで、VPP, IPP の切り出しに関与する重要な遺伝子群を推測することを目的とした。

## 3.2. 実験材料および方法

### 3.2.1. ペプチド、アミノ酸添加による *L. helveticus* CM4 株の血圧降下ペプチド産生量への影響

蛋白質分解活性の高い株として分離された *L. helveticus* CM4 株(EU patent, 1016709, 1991)を 9%(w/w)脱脂粉乳で 37°C、24 時間培養しスターターとして用いた。スターターを新たに調製した 9%(w/w)脱脂粉乳に 5%(v/v)添加し 37°Cで 25 時間、50%NaOH を用いて pH を 6.0 に保ちながら培養した。ペプチド添加実験では、動物由来蛋白質加水分解物で VPP、IPP 配列を含まないペプチド混合物(ペプトン:BD)を使用した。培養開始 3 時間後にペプトンを 2%(w/v)になるように添加し(+ペプチド)、比較対照としてペプトンを添加しないサンプルを用意した(-ペプチド)。培養開始 3、5、6、7、9、11、13、16、19 および 25 時間にサンプルをそれぞれ回収し、VPP および IPP の定量を 2 章に記載の方法で行った。アミノ酸添加実験では、9%(w/w)脱脂粉乳にスターターを 5%添加し、2%の各アミノ酸(Gln, Ala, Thr, Pro, Tyr, Asn, Val, Ser, Met, Phe, Leu, Ile, Gly)を添加または未添加の条件で、37°C、24 時間培養した。VPP、IPP の産生量はアミノ酸を添加しないサンプルに対する割合で示した。

### 3.2.2. ペプチド添加による菌体外プロティナーゼ活性測定

上記の方法で、培養およびペプチド添加を行い、1、3.5、4、5、6 および 7 時間後にサンプルを回収し、菌体外プロティナーゼ活性を 2 章に記載の方法で測定した。

### 3.2.3. DNA マイクロアレイ解析

乳培地での *L. helveticus* CM4 株の培養において、ペプチド添加が遺伝子転写量に与える影響を網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイ解析を行った。上記のペプチド添加実験の方法で乳酸菌の培養およびペプチド添加を行い、ペプチド添加後 0.5 および 2 時間後に RNA 抽出用のサンプルを回収した。サンプルはすぐに 2 倍量の RNA Protect Bacteria Reagent (キアゲン) と混合し、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体をリゾチーム処理、ホットフェノール処理、RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて全 RNA を抽出した。以降の操作は、ロシュ・ニンブルジェン社のプロトコールに従い (NimbleGen Arrays User's Guide: Gene Expression Arrays Version 6.0)、抽出した全 RNA から cDNA を合成し DNA マイクロアレイに用いた。CM4 株のゲノム配列を用いて、ロシュ・ニンブルジェン社のプロトコールに従い、DNA チップを作製した。一部の遺伝子を除いて、1 遺伝子あたり 8 種の 60mer プローブを用いて評価した。1 つのプローブに対して 4 箇所の重複を含む全遺伝子に対する DNA アレイをデザインした。アレイチップは 4X72k を使用した。ハイブリダイゼーションの結果については NimbleScan Software を用いて、スキャンおよびノーマライゼーションを行った (Bolstad *et al.*, 2003; Irizarry *et al.*, 2003a; Irizarry *et al.*, 2003b)。ペプチドを添加しないサンプルをコントロールとして、発現量の変化を調べた。

## 3.3. 結果

### 3.3.1. ペプチド添加による血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生抑制

乳培地中に添加したペプチドやアミノ酸が血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生に与える影響を確認した。ペプチド混合物(ペプトン;BD)を添加しない場合、*L. helveticus* CM4 株の発酵乳中の VPP, IPP 産生量は培養時間とともに 13 時間程度まで増加した(図 3.1)。しかしながら、ペプトンをペプチド混合物として培養 3 時間後に 2% 添加した場合、発酵乳中の VPP, IPP 産生量は添加直後から著しく低下した。培養 13 時間後の VPP と IPP の産生量はペプチド添加によりそれぞれ 9% と 33% に低

下していた。このときの菌体の増殖性を濁度で確認したところ、ペプチド添加によりわずかに速くなっていたものの大きな違いはなかった（データ示さず）。また、今回使用したペプトンの代わりにソイトンなどのペプチド混合物の添加によっても、同様に血圧降下ペプチドの産生抑制が確認された。これらの結果から、乳培地での *L. helveticus* CM4 株の培養において、ペプチドの種類に関係なくその添加によって血圧降下ペプチドの加工が抑制されることが示された。

### 3.3.2. ペプチド添加による菌体外プロティナーゼ活性の抑制

*L. helveticus* の乳培地での培養時にペプチドを添加することで、血圧降下ペプチドの産生が抑制されることから、蛋白質分解系酵素の活性への影響を評価した。まず、蛋白質を最初に分解する酵素として重要な菌体外プロティナーゼの活性に、ペプチド添加が与える影響を確認した。血圧降下ペプチド産生量を確認した実験(培養開始 3 時間後に 2%のペプチドを添加)のサンプルの一部を用いて、培養開始 1、3、3.5、4.5、5、6 および 7 時間後の菌体外プロティナーゼ活性(Prt 活性)を測定した。ペプチドを添加しない場合、Prt 活性は培養開始 1 から 3.5 時間後にかけて著しく上昇した(図 3.2)。しかし、培養 3 時間後に 2%のペプチドを添加した場合、Prt 活性は著しく低下した。この結果は、血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の産生量(図 3.1)と相関していた。これらの結果から、*L. helveticus* CM4 株において、ペプチド添加による菌体外プロティナーゼ活性の抑制が明らかにされ、同時に血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の産生における菌体外プロティナーゼの重要性が確認された。

### 3.3.3. 単独のアミノ酸による血圧降下ペプチド(VPP, IPP)産生抑制

ペプチドの混合物の添加により、菌体外プロティナーゼ活性の低下、および発酵乳中での血圧降下ペプチドの産生抑制が確認されたため、各アミノ酸が単独で血圧降下ペプチドの加工に与える影響を確認した。乳に 13 種類のアミノ酸をそれぞれ単独で 2%添加し、非添加サンプル中の血圧降下ペプチド(VPP, IPP)量と比較した。13 種類のアミノ酸(Gln, Ala, Thr, Pro, Tyr, Asn, Val, Ser, Met, Phe, Leu, Ile および Gly)のうち、Gly, Ile, および Leu は抑制効果が強かった。Phe, Met, Ser および Val は弱いながら血圧降下ペプチド産生を抑制した(図 3.3)。

### 3.3.4. ペプチド添加による蛋白質分解系遺伝子の転写抑制

*L. helveticus* CM4 株の乳培地での培養時にペプチドを添加することで、菌体外プロテイナーゼ活性、および血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の産生量が抑制されることが示されたため、ペプチドの添加が *L. helveticus* 種の遺伝子の転写量、特に蛋白質分解系遺伝子の転写量に与える影響を確認するため、DNA マイクロアレイを用いて全遺伝子の転写量を網羅的に解析した。培養開始 3 時間後にペプチドを発酵乳に 2%(w/v) 添加し、ペプチド添加 0.5 および 2 時間後の *L. helveticus* CM4 株の遺伝子転写量を解析した。蛋白質分解系遺伝子の多くはペプチド添加により転写抑制された(表 3.1)。総遺伝子 2174 のうち、ペプチド添加により 0.5 時間後の転写量が 75%もしくは 50%以下に低下した遺伝子数は、449/2174(21%)、271/2174(12%)であった(データ未掲載)。表 3.1 には蛋白質分解系遺伝子のうちアミノ酸トランスポーターを除く 35 種に関する結果を示した。転写量が同様に低下した遺伝子数はそれぞれ、16/35(46%)、9/35(26%)であり、全遺伝子の抑制の程度に比べ蛋白質分解系遺伝子群で転写量が低下する遺伝子の割合が高いことがわかる。多くのアミノ酸に対し要求性を示す乳酸菌の蛋白質分解系遺伝子は、その多くが窒素源としてのアミノ酸の獲得のために発現すると考えられており、菌体内のアミノ酸濃度に応じて、蛋白質分解系の過剰な発現を制御している(負のフィードバック)と考えられる。

詳細には、菌体外プロテイナーゼ遺伝子としてアノテーションされている 2 つの遺伝子のうち、*prtY* 遺伝子の転写量はペプチド添加による影響がなかったが、*prtH2* 遺伝子の転写は著しく低下した。エンドペプチダーゼは血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の前駆ペプチドからの切り出しに重要と考えられているが、多くのエンドペプチダーゼ遺伝子はペプチド添加 0.5 時間後に著しく転写が低下していた(表 3.1)。具体的には、*pepE*、*pepO1*、*pepO2* および *pepO3* のエンドペプチダーゼ遺伝子は、0.5 時間後にはそれぞれ 0.33、0.75、0.07 および 0.77 倍に転写量が低下していた。さらに *pepO2* 遺伝子はペプチド添加 2 時間後も転写抑制されていた(表 3.1)。X-プロリル・ジペプチジル・アミノペプチダーゼ(X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase ; XPDAP)は N 末端の X-Pro 配列を認識して Pro のカルボキシ末端を切断する活性を持つことから、VPP, IPP のアミノ末端配列の加工に必要と考えられているが、*pepX* 遺伝子の転写はペプチド添加による変動が確認できなかった。アミノペプチダーゼ遺伝子の中では、*pepCE* と *pepN2* 遺伝子の転写量が低下していた。VPP, IPP の切り出しに関与しないと考えられるジペプチダーゼおよびトリペプチダーゼの中では、*pepT2* と *pepV* 遺伝

子の転写が低下した。さらに全てのペプチドトランスポーター遺伝子は転写量が抑制されていた。また、多くのアミノ酸輸送体遺伝子は、乳培地へのペプチド添加により転写量が減少した(表 3.2)。例えば、*hisM*, *potE*, *glnQ*, *hisJ*, *rhaT*, *med*などのアミノ酸輸送に関わる遺伝子群の転写が抑制された。まとめると、乳培地へのペプチド添加により、非添加の場合と比較して、多くの蛋白質分解系遺伝子の転写が抑制された。さらに、血圧降下ペプチド(VPP, IPP)の切り出しに関与すると考えられる遺伝子についても、菌体外プロテイナーゼ群、エンドペプチダーゼ群、ペプチドトランスポーター群の遺伝子が多く抑制されていた。

### 3.3.5. ペプチド添加による蛋白質分解系以外の遺伝子の転写への影響

*L. helveticus* CM4 株の乳培地での培養時にペプチドを添加することで蛋白質分解系遺伝子以外の転写量への影響について評価した。転写量が増加、または低下した遺伝子の上位 200 遺伝子のうち、機能がアノテーションされている遺伝子で蛋白質分解系以外の遺伝子を表 3.2 および表 3.3 にまとめた。*tra5*, *acrR*, *glpR*などの転写調節因子遺伝子と *salY*, *mgtA*, *lacY*などの輸送体遺伝子の転写量は上昇した(表 3.3)。これらの転写調節された遺伝子の変動は、ペプチド添加後 2 時間よりも 0.5 時間後のほうが大きかった。

### 3.4. 考察

本章の検討で、過去に示唆されていた *L. helveticus* 種の発酵乳内での後期発酵過程におけるペプチドあるいはアミノ酸の蓄積が多くの蛋白質分解系遺伝子群の活性および転写に抑制的に働くことを DNA マイクロアレイ解析により詳細に明らかにすることが出来た。これらの結果から、菌体内アミノ酸濃度に依存して蛋白質分解系の転写が抑制されている可能性が示唆された。また同時に、これら蛋白質分解系遺伝子群の転写抑制により機能性ペプチドの生産が抑制されることが示され、その生産性評価から、BCAAs を含む単独のアミノ酸によっても蛋白質分解系遺伝子の転写が抑制される可能性が示された。

本検討では、菌体外プロテイナーゼとして報告のある *prtY*遺伝子の転写は、ペプチド添加により抑制されなかった。乳酸球菌では、菌体外プロテイナーゼは翻訳後に活性化因子の働きにより活性化する(Siezen, 1999)。乳酸桿菌である *L. helveticus* 種においても翻訳後に活性化因子の必要性が示唆されているため(Yamamoto *et al.*,

1995)、その活性化因子の転写が抑えられた可能性がある。一方で、*L. helveticus* 種に共通する菌体外プロテイナーゼ遺伝子と報告がある *prtH2* 遺伝子(Genay *et al.*, 2009)の転写は、ペプチド添加により著しく抑制された。本検討の結果から考えると、*L. helveticus* CM4 株において活性と連動して転写が低下した *prtH2* 産物が菌体外プロテイナーゼ活性の主要な酵素である可能性も考えられる。*prtH2* を含む *prtH1~4* 遺伝子産物がプロテイナーゼ活性を有することの直接の証明はなされていないが、他の乳酸菌で報告がある PrtP との相同性が高く、セリンプロテイナーゼに共通の活性中心が保存されていることや(Broadbent *et al.*, 2011)、*prtH2*は *L. helveticus* 種に保存された菌体外プロテイナーゼ遺伝子という報告(Genay *et al.*, 2009)や、*L. helveticus* 種から単離された菌体外プロテイナーゼが 180kDa で *prtH1~4* の分子種の遺伝子産物の推定分子量と一致するという報告(Sadat-Mekmene *et al.*, 2011)があり、これらは CM4 株においても *prtH2* 遺伝子産物が菌体外プロテイナーゼ活性の主要な酵素である可能性を支持する。しかし、完全な理解には *L. helveticus* CM4 株の *prtY* もしくは *prtH2* 欠損株などでの解析が必要になる。さらに、プロテイナーゼ活性化因子とその機構について解明が必要になる。

発酵乳へのペプチドの添加・非添加時の転写量と血圧降下ペプチド産生の影響から、*L. helveticus* CM4 株による血圧降下ペプチド、VPP、IPP の切り出し工程について考察した。*L. helveticus* 種の乳酸菌が VPP、IPP を乳蛋白質から切り出す工程で、菌体外プロテイナーゼは乳中の蛋白質を最初に分解しオリゴペプチドを切り出すため、最も重要な酵素のひとつである(Yamamoto *et al.*, 1993)。上述のように、菌体外プロテイナーゼ活性のペプチド添加による低下、プロテイナーゼ遺伝子候補 *prtH2* の転写量の低下が確認され、血圧降下ペプチド産生量の低下と相関があったことから、血圧降下ペプチドの産生における菌体外プロテイナーゼの重要性が、本検討によっても示された。転写が抑制されたエンドペプチダーゼ遺伝子のなかで *pepO1* と *pepO2* 遺伝子産物は、過去の酵素活性、基質特異性の検討で VPP、IPP の C 末端の切断活性をもつことが示唆されている(Chen & Steele, 1998; Chen *et al.*, 2003)。N 末端の切り出しに必要と考えられる、X-Pro 配列を切り出す XPDAP とアノテーションされた *pepX* 遺伝子の転写は抑制されなかったが、アミノペプチダーゼである *pepCE*、*pepN2* 遺伝子(Varmanen *et al.*, 1994)の転写は抑制された。オリゴペプチドトランスポーターを構成する *dppB*、*dppC*、*dppD*、*dppF*等の遺伝子転写は抑制されていたが、これらの遺伝子産物も前駆ペプチドの菌体内への取り込みに関わると推定

されるため、VPP、IPP の切り出しに重要であると考えられる。これらの結果から、VPP、IPP の切り出しに関与すると考えられる多くの蛋白質分解系遺伝子は、発酵乳へのペプチド添加によって、転写が抑制されることが示唆された。

本検討では、発酵初期に 2%のペプチドを 9%脱脂粉乳培地に添加して、ペプチドを添加しない場合と比較し、遺伝子転写量の変化を評価した。9%脱脂粉乳中の蛋白質含量が約 3%程度であること、および *L. helveticus* CM4 株の発酵終了後の発酵乳中のペプチド濃度は約 0.5%であることを確認している（データ示さず）。さらに、添加するペプチド濃度を 0.2%まで低下させても、菌体外プロテイナーゼ活性および血圧降下ペプチド産生量が抑制されることが確認されている。アミノ酸供給源としてのペプチドのインパクトを評価するためには、平均ペプチド長を評価する必要があるが、通常発酵乳中に蓄積されるペプチド量によっても、本試験での添加ペプチドと同様に蛋白質分解系遺伝子群の転写抑制が生じると考えられる。これらのことを総合的に考えると、発酵乳に蛋白質分解作用により生産され蓄積された過剰なペプチドが蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制することで、結果として VPP、IPP の加工生産が抑制されることが推察された。VPP、IPP の切り出しプロセスとペプチド添加による産生抑制を推定して図 3.4 にまとめた。

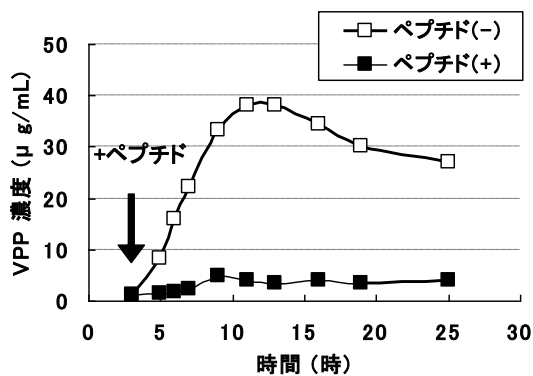
*L. helveticus* の菌体外プロテイナーゼ活性の欠損株において、乳培地中では生育不良となることや、アミノ酸もしくはペプチドを添加した乳培地では生育することができることから、初期の乳蛋白質の分解において菌体外プロテイナーゼは必須である (Yamamoto *et al.*, 1995)。 *L. helveticus* CNRZ32 株を用いた報告では、アミノ酸・ペプチドが豊富な MRS 培地で培養した場合と比較して乳培地で培養した場合、蛋白質分解系、アミノ酸代謝系、炭水化物代謝等の多くの遺伝子群の転写量が上昇するとの報告がある (Smeianov *et al.*, 2007)。培地中のペプチドは主にオリゴペプチドトランスポーターによって菌体内に取り込まれ、菌体内のペプチダーゼによりアミノ酸まで分解される (Detmers *et al.*, 1998)。これらのことから、菌体内に蓄積したアミノ酸が蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制する可能性が示され、アミノ酸濃度依存的に転写を調節する転写調節因子の存在が示唆された。本検討で使用したペプチドの代わりにアミノ酸の発酵乳への添加の影響を確認したところ、ペプチドと同様に菌体外プロテイナーゼ活性の抑制と、VPP、IPP 産生の抑制が確認された(データ未掲載)。しかし、その抑制の程度は、アミノ酸と比べペプチド添加で大きかった。このことは、乳酸菌で一般的に示されているように *L. helveticus* 種においてもペプチドはアミノ酸と比



べて培地中からの菌体内への取込効率が高く、アミノ酸の獲得にはペプチドの方がより効率的であることが考えられる。しかしながら、*L. helveticus* 種では菌体内アミノ酸の濃度を感知し蛋白質分解系遺伝子の転写を調節する因子や機構についての報告はない。本検討で見出した蛋白質分解系の転写調節のさらなる理解には、それに関わる転写調節因子の同定とその機能解析が必要である。

これらのアミノ酸による蛋白質分解酵素遺伝子群への転写調節システムに関しては、*L. lactis* 種や *B. subtilis* 種で、CodY と呼ばれる転写調節因子が分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) を認識し、蛋白質分解系遺伝子の転写を調節することが報告されている (Belitsky & Sonenshein, 2008; den Hengst *et al.*, 2005b)。*L. lactis* 種において、蛋白質分解系遺伝子の中でも、菌体外プロテイナーゼ *prtP* やオリゴペプチドトランスポーター *opp* オペロン、アミノペプチダーゼの *pepN*、*pepC*、*pepX* が合成培地へのカゼイン蛋白質由来のペプチド混合物であるカジトンの添加によって転写が抑制されることが示されている (Guédon *et al.*, 2001)。これらの機能をもった遺伝子群は、表 3.1 に示したように本検討の *L. helveticus* CM4 株においても転写抑制が確認されている。また、*L. lactis* 種の *codY* 欠損株では蛋白質分解系のペプチドトランスポーターや、蛋白質分解系以外ではアミノ酸トランスポーターやその他のトランスポーター、アミノ酸代謝系の遺伝子の転写が増加することが示されている (den Hengst *et al.*, 2005b)。本検討においても表 3.2 に示すように、トランスポーター遺伝子やアミノ酸代謝に関わる遺伝子群の転写がペプチド添加によって抑制されていた。さらに、本検討で *L. helveticus* CM4 株による VPP、IPP の生産は、BCAAs を含むアミノ酸単体でも抑制された (図 3.2)。*L. lactis* 種の報告例と本検討での *L. helveticus* 種のペプチドによって抑制される遺伝子群の機能の類似性、さらに *L. lactis* 種における CodY の機能を考慮に入れると、*L. helveticus* 種においても CodY と類似の BCAAs に応答した蛋白質分解系群の転写制御機能をもつ蛋白質が存在していると考えられる。しかしながら、CM4 株を含む *L. helveticus* 種のゲノムには *codY* と相同性の高い遺伝子は存在しないことから、相同性解析以外のアプローチによる同制御システムに関与する分子の特定が必要と考えられる。

### VPP濃度



### IPP濃度

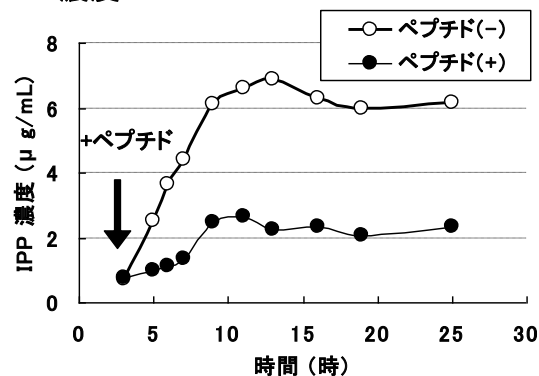


図 3.1 ペプチド添加による*L. helveticus* CM4発酵乳中の血圧降下ペプチド産生への影響 *L. helveticus* CM4株を9%(w/w)脱脂粉乳で37°Cで、NaOHでpHを6に保ちながら培養し、培養3時間後に終濃度2%のペプチド(ペプトン;BD)を添加した(図中↓)。各時間におけるVPPおよびIPP量をLC-MSMSで定量した。ペプチド非添加時のVPPを□、IPPを○で、添加時のVPPを■、IPPを●で示す。

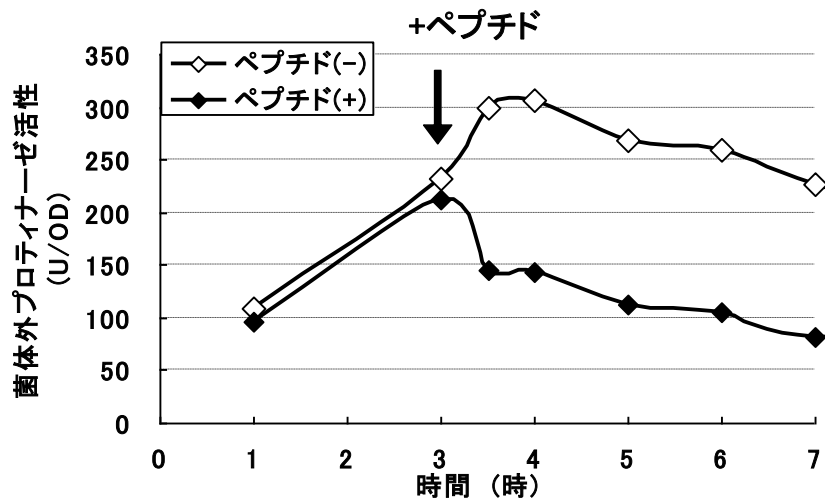


図 3.2 菌体外プロテイナーゼ活性に与えるペプチド添加の影響

*L. helveticus* CM4株を9% (w/w)脱脂粉乳で37°Cで、NaOHでpHを6に保ちながら培養し、培養3時間後(↓)に終濃度2%のペプチド(ペプトン)を添加した。菌体外プロテイナーゼ活性を経時的に測定し、ペプチド非添加を◇で、添加を◆で示した。

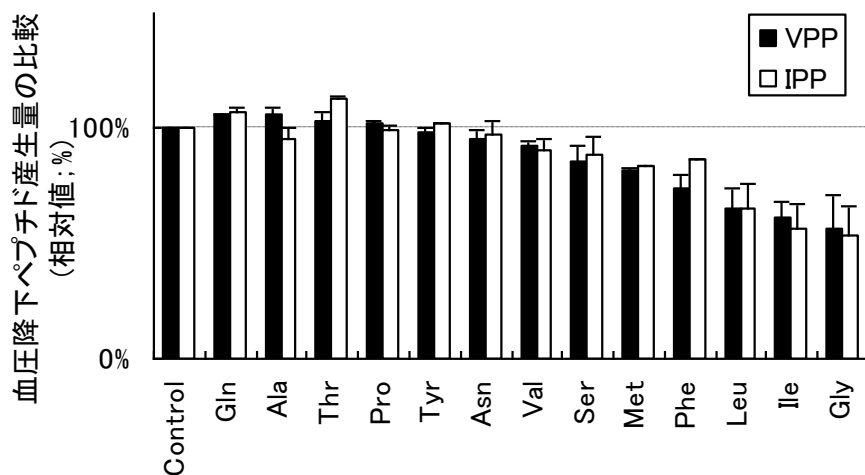


図 3.3 血圧降下ペプチド産生に与える各種アミノ酸の影響評価 各種アミノ酸を終濃度2%で添加した9%(w/w)脱脂粉乳で*L. hleveticus* CM4株を37°Cで24時間培養後の血圧降下ペプチド(VPP、IPP)量をLC-MSMSで定量した。結果はアミノ酸を添加しないコントロールを100%としたときの相対値で示した。(■)がVPPを、(□)がIPPを示す。

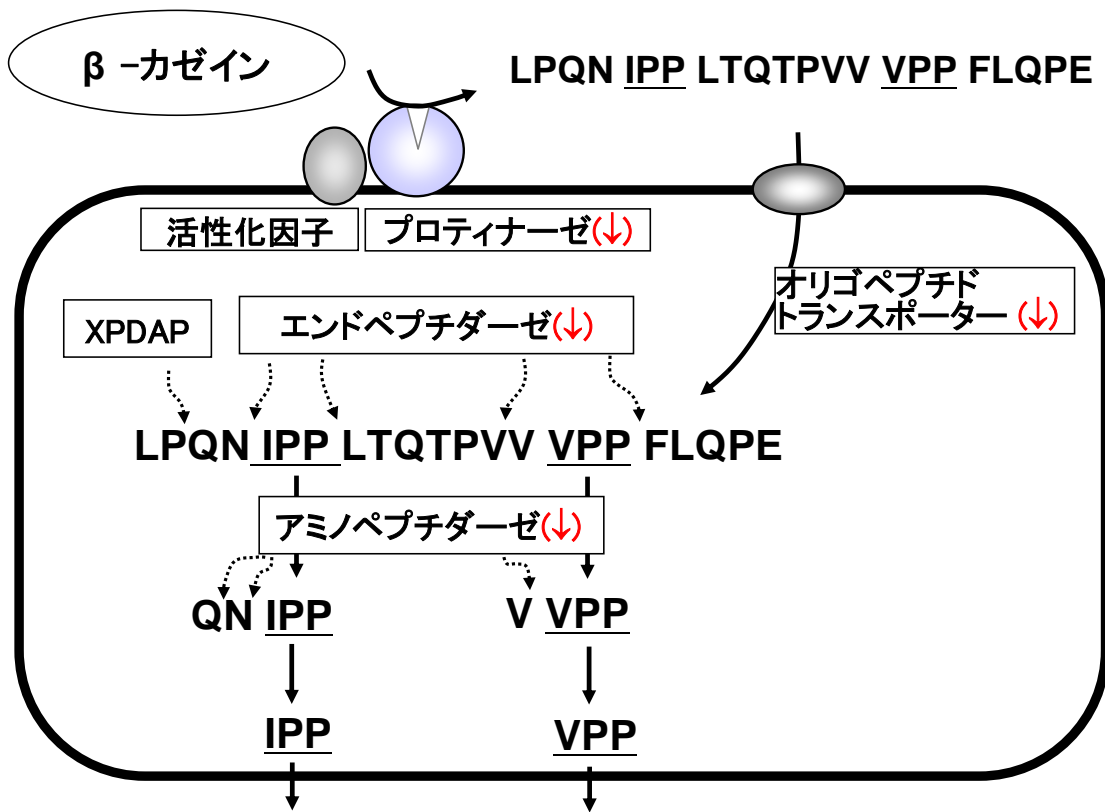


図 3.4. *L. helveticus* 発酵乳に生産される血圧降下ペプチドの加工プロセスとアミノ酸によるその抑制機構の推定 乳中の $\beta$ -カゼインは菌体外プロテイナーゼによって分解され、オリゴペプチドとなる。オリゴペプチドはトランスポーターによって取り込まれ、菌体内のペプチダーゼによってアミノ酸まで分解される。その過程で分解されにくい配列としてIPP、VPPが産生される。ペプチドによる遺伝子転写抑制が確認された酵素群は(↓)で示した。VPP、IPP配列には下線を記した。実線矢印は蛋白質の分解の流れを示し、点線矢印は各酵素群の切断点を示した。オリゴペプチド配列は発酵乳中から検出された配列を記載した。

表3.1 *L. helveticus* CM4株発酵乳へのペプチド添加による  
 蛋白質分解系遺伝子の転写量変化

機能	遺伝子名	ORF ID	転写量の変化率*	
			0.5h**	2h**
プロティナーゼ	<i>prtY</i>	x05301 01612	1.04	0.98
	<i>prtH2</i>	x05301 01219	0.15	0.20
プロティナーゼ活性化因子	<i>prtM2</i>	x05301 01238	1.23	1.33
アミノペプチダーゼ	<i>pepC2</i>	x05301 01453	1.18	0.93
	<i>pepN</i>	x05301 02039	1.05	0.74
	<i>pepN2</i>	x05301 01212	0.31	0.75
	<i>pepCE</i>	x05301 00536	0.32	0.72
	<i>pepM</i>	x05301 00322	1.06	0.45
	<i>aminopeptidase I zinc metalloprotease</i>	x05301 00297	0.91	1.15
X-プロリルジペプチジルペプチダーゼ	<i>pepX</i>	x05301 00997	1.11	1.32
エンドペプチダーゼ	<i>pepE</i>	x05301 01585	0.33	1.08
	<i>pepE2</i>	x05301 01588	0.91	1.26
	<i>pepF</i>	x05301 02091	0.93	1.07
	<i>pepO1</i>	x05301 00924	0.75	1.18
	<i>pepO2</i>	x05301 00724	0.07	0.36
	<i>pepO3</i>	x05301 01619	0.72	0.99
トリペプチダーゼ	<i>pepT</i>	x05301 00852	1.03	1.36
	<i>pepT2</i>	x05301 00661	0.11	0.70
ジペプチダーゼ	<i>pepD2</i>	x05301 00946	1.55	1.47
	<i>pepD3</i>	x05301 00007	1.51	1.33
	<i>pepD4</i>	x05301 02052	0.98	1.12
	<i>pepD3t</i>	x05301 01758	1.09	1.02
	<i>pepV</i>	x05301 00745	0.73	0.83
	<i>pepDA</i>	x05301 01552	1.28	0.45
プロリダーゼ	<i>pepQ</i>	x05301 01340	0.44	1.07
	<i>pepQ2</i>	x05301 00984	1.38	1.09
プロリナーゼ	<i>pepPN</i>	x05301 02166	1.30	1.88
プロリンイミノペプチダーゼ	<i>pepI</i>	x05301 01696	1.27	1.15
ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ	<i>pcp</i>	x05301 01597	2.02	0.93
ペプチドトランスポーター	<i>ddpA1</i>	x05301 00950	0.38	0.60
	<i>ddpA2</i>	x05301 01032	0.07	0.27
	<i>dppB</i>	x05301 00952	0.61	0.98
	<i>dppC</i>	x05301 00951	0.56	1.05
	<i>dppD</i>	x05301 00954	0.66	1.11
	<i>dppF</i>	x05301 00953	0.57	1.02

蛋白質分解系遺伝子群のうちアミノ酸トランスポーター以外の遺伝子

\* ペプチド非添加時をコントロールとしたときのペプチド添加時の転写量の変化率

\*\* ペプチド添加後の時間

表 3.2 ペプチド添加によって転写量が減少した*L. helveticus* CM4株の遺伝子

ORF ID	遺伝子名	転写量変化		遺伝子産物
		0.5h**	2h**	
<b>&lt;トランスポーター&gt;</b>				
x05301 01029	<i>hisM</i>	0.05	0.26	ABC-type amino acid transport system, permease component
x05301 00726	<i>potE</i>	0.07	0.37	Amino acid transporters
x05301 01027	<i>glnQ</i>	0.08	0.37	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component
x05301 01026	<i>hisJ</i>	0.08	0.36	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain
x05301 01925	<i>rhaT</i>	0.09	0.46	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
x05301 01099	<i>med</i>	0.09	1.21	Uncharacterized ABC-type transport system, periplasmic component/surface lipoprotein
x05301 00765	<i>hisM</i>	0.09	0.09	ABC-type amino acid transport system, permease component
x05301 01028	<i>hisM</i>	0.09	0.38	ABC-type amino acid transport system, permease component
x05301 00513	<i>nlpA</i>	0.10	1.35	ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface
x05301 00944	<i>potE</i>	0.11	0.56	Amino acid transporters
x05301 00768	<i>hisJ</i>	0.11	0.08	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain
x05301 00002	<i>pnuC</i>	0.12	0.14	Nicotinamide mononucleotide transporter
x05301 00766	<i>hisM</i>	0.13	0.10	ABC-type amino acid transport system, permease component
x05301 00767	<i>glnQ</i>	0.13	0.11	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component
x05301 01941	<i>proP</i>	0.15	1.19	Permeases of the major facilitator superfamily
x05301 01901	<i>ansP; lysP</i>	0.22	0.51	Gamma-aminobutyrate permease and related permeases; Amino acid transporters
x05301 02160	<i>ugpB</i>	0.25	0.30	ABC-type sugar transport system, periplasmic component
x05301 01902	<i>ansP</i>	0.25	0.44	Gamma-aminobutyrate permease and related permeases
x05301 02139	<i>potE</i>	0.26	1.02	Amino acid transporters
x05301 00576	<i>potE</i>	0.28	0.92	Amino acid transporters
x05301 01637	<i>phnD</i>	0.29	0.39	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, periplasmic
x05301 00043	<i>ansP</i>	0.29	0.64	Gamma-aminobutyrate permease and related permeases
x05301 01636	<i>glnQ</i>	0.32	0.54	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, ATPase component
<b>&lt;その他&gt;</b>				
x05301 00469	<i>abgB</i>	0.09	0.12	Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase
x05301 00467	<i>lysA</i>	0.09	0.14	Diaminopimelate decarboxylase
x05301 01926	<i>spr</i>	0.12	0.65	Cell wall-associated hydrolases (invasion-associated proteins)
x05301 00508	<i>folA</i>	0.12	0.18	Dihydrofolate reductase
x05301 01113	<i>purK</i>	0.12	1.36	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (NCAIR synthetase)
x05301 01624	<i>nrdD</i>	0.13	0.09	Oxygen-sensitive ribonucleoside-triphosphate reductase
x05301 00470	<i>dapA</i>	0.13	0.17	Dihydrodipicolinate synthase/N-acetylneuraminase lyase
x05301 00507	<i>tysY</i>	0.13	0.19	Thymidylate synthase (EC 2.1.1.45) (TS) (TSase).
x05301 01916	<i>purA</i>	0.14	0.99	Adenylosuccinate synthase
x05301 00468	<i>dapD</i>	0.14	0.20	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase
x05301 00770	<i>tra5</i>	0.15	0.17	Transposase and inactivated derivatives
x05301 00471	<i>dapB</i>	0.15	0.18	Dihydrodipicolinate reductase
x05301 00737	<i>hpt</i>	0.17	1.47	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
x05301 01048	<i>gpmB</i>	0.17	1.01	Fructose-2,6-bisphosphatase
x05301 02165	<i>add</i>	0.17	1.01	Adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) (Adenosine aminohydrolase).
x05301 01114	<i>purE</i>	0.17	1.20	Phosphoribosylcarboxyaminoimidazole (NCAIR) mutase
x05301 01047	<i>serC</i>	0.17	1.20	Phosphoserine aminotransferase
x05301 01009	<i>pyrD</i>	0.18	0.70	Dihydroorotate dehydrogenase
x05301 00125	<i>apbA</i>	0.18	1.53	Ketopantoate reductase
x05301 01112	<i>purC</i>	0.19	1.14	Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide (SAICAR) synthase
x05301 01115	<i>misI</i>	0.20	1.16	Formyltetrahydrofolate synthetase
x05301 02023	<i>cysE</i>	0.21	0.20	Serine acetyltransferase
x05301 01046	<i>serA</i>	0.22	1.11	Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases
x05301 01543	<i>guaA</i>	0.23	1.24	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.2) (Glutamine amidotransferase) (GMP synthetase).
x05301 00698	<i>msrA</i>	0.23	1.00	Peptide methionine sulfoxide reductase
x05301 01110	<i>purQ</i>	0.24	1.10	Phosphoribosylformylglycinamide synthase I (EC 6.3.5.3) (FGAM
x05301 00876	<i>eis</i>	0.24	0.49	Predicted acetyltransferase involved in intracellular survival and related acetyltransferases
x05301 02021	<i>cysK</i>	0.24	0.38	Cysteine synthase
x05301 02164	<i>ntd</i>	0.24	1.02	Nucleoside deoxyribosyltransferase (EC 2.4.2.6) (N-
x05301 00700	<i>gloA</i>	0.25	0.90	Lactoylglutathione lyase and related lyases
x05301 01111	<i>purS</i>	0.25	1.11	Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, PurS component
x05301 00486	<i>pncA</i>	0.27	0.59	Amidases related to nicotinamidase
x05301 02010	<i>luxS</i>	0.28	0.74	LuxS protein involved in autoinducer AI2 synthesis
x05301 00674	<i>cdd</i>	0.29	0.57	Cytidine deaminase
x05301 01780	<i>phnD</i>	0.30	1.36	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, periplasmic
x05301 01586	<i>guaB</i>	0.31	0.87	IMP dehydrogenase/GMP reductase
x05301 00487	<i>pncB</i>	0.31	0.69	Nicotinic acid phosphoribosyltransferase

\* ペプチド非添加時をコントロールとしたときのペプチド添加時の転写量変化率

\*\* ペプチド添加後の時間

表 3.3 ペプチド添加によって転写量が増加した*L. helveticus* CM4株の遺伝子

ORF ID	遺伝子名	転写量変化率*		遺伝子産物
		0.5h**	2h**	
<b>&lt;転写調節因子&gt;</b>				
x05301 01339	<i>tra5</i>	23.91	0.89	Transcriptional regulators
x05301 02049	<i>acrR</i>	9.96	3.64	Transcriptional regulator
x05301 02078	<i>glpR</i>	7.83	1.17	Transcriptional regulators of sugar metabolism
x05301 00249	<i>ompR</i>	2.38	0.86	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain
x05301 00900	<i>dnaJ</i>	1.95	2.21	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain
x05301 01395	<i>phnF</i>	1.89	1.10	Transcriptional regulators
<b>&lt;トランスポーター&gt;</b>				
x05301 02050	<i>salY</i>	9.95	4.30	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component
x05301 01457	<i>mgta</i>	3.18	0.90	Cation transport ATPase
x05301 01122	<i>lacY</i>	3.45	1.05	Lactose permease (Lactose-proton symporter) (Lactose transport protein) (Lactose transporter).
x05301 01017	<i>mgta</i>	2.43	1.73	Cation transport ATPase
x05301 00382	<i>mdlB</i>	2.24	2.78	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components
x05301 00383	<i>mdlB</i>	2.23	2.41	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components
x05301 00156	<i>mgta</i>	2.06	2.38	Cation transport ATPase
x05301 01894	<i>salY</i>	2.06	1.30	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component
x05301 01133	<i>tra5</i>	2.03	1.21	Transposase and inactivated derivatives
x05301 01314	<i>proP</i>	1.89	2.07	Permeases of the major facilitator superfamily
<b>&lt;その他&gt;</b>				
x05301 00868	<i>yd26</i>	10.38	2.14	Hypothetical UPF0085 protein LJ1326.
x05301 02081	<i>fruA</i>	8.81	1.16	Phosphotransferase system, fructose-specific IIC component
x05301 02079	<i>fruK</i>	7.36	1.07	Fructose-1-phosphate kinase and related fructose-6-phosphate kinase
x05301 00247	<i>manA</i>	4.33	0.94	Phosphomannose isomerase
x05301 01004	<i>carB</i>	4.23	4.29	Carbamoylphosphate synthase large subunit (split gene in MJ)
x05301 02048	<i>gpmB</i>	3.93	1.66	Fructose-2,6-bisphosphatase
x05301 01005	<i>carA</i>	3.06	3.92	Carbamoylphosphate synthase small subunit
x05301 00443	<i>def</i>	2.90	2.58	Peptide deformylase (EC 3.5.1.88) (PDF) (Polypeptide deformylase).
x05301 01006	<i>pyrC</i>	2.86	5.03	Dihydroorotase and related cyclic amidohydrolases
x05301 00045	<i>glmS</i>	2.85	0.44	Glucosamine 6-phosphate synthetase, contains amidotransferase and phosphosugar isomerase domains
x05301 00565	<i>syh</i>	2.81	0.70	Histidyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.21) (Histidine--tRNA ligase) (HisRS).
x05301 00566	<i>aspS</i>	2.73	1.60	Aspartyl-tRNA synthetase
x05301 00519	<i>fumC; aspA</i>	2.69	0.95	Fumarase; Aspartate ammonia-lyase
x05301 00520	<i>sdhA</i>	2.66	1.20	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit
x05301 01442	<i>xyIB</i>	2.65	1.30	Sugar (pentulose and hexulose) kinases
x05301 00432	<i>pfs</i>	2.50	1.91	Nucleoside phosphorylase
x05301 00403	<i>folC</i>	2.45	2.43	Folylpolyglutamate synthase
x05301 01123	<i>nagE</i>	2.44	1.06	Phosphotransferase system IIA components
x05301 01643	<i>ntd</i>	2.42	1.11	Nucleoside deoxyribosyltransferase (EC 2.4.2.6) (N-
x05301 00433	<i>nifS</i>	2.42	1.68	Cysteine sulfinatase desulfurase/cysteine desulfurase and related enzymes
x05301 00038	<i>manZ</i>	2.42	0.68	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IID
x05301 00036	<i>ptnA</i>	2.28	0.57	PTS system, mannose-specific IIAB component (EIIAB-Man)
x05301 00532	<i>mdh</i>	2.15	1.12	Malate/lactate dehydrogenases
x05301 00862	<i>recO</i>	2.10	0.85	Recombinational DNA repair protein (RecF pathway)
x05301 01315	<i>metK</i>	2.09	2.02	S-adenosylmethionine synthetase
x05301 00402	<i>valS</i>	2.06	2.12	Valyl-tRNA synthetase
x05301 02120	<i>capC</i>	2.06	1.19	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
x05301 01082	<i>galM</i>	2.02	1.07	Galactose mutarotase and related enzymes
x05301 00250	<i>baeS</i>	2.02	1.08	Signal transduction histidine kinase
x05301 01369	<i>xerC</i>	2.01	1.01	Integrase
x05301 00301	<i>ptsA</i>	1.98	0.72	Phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system EI component in
x05301 01263	<i>yla3</i>	1.97	1.38	Hypothetical 14.4 kDa protein in <i>laf</i> 3' region.
x05301 00037	<i>manY</i>	1.95	0.70	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIC
x05301 01129	<i>bgaM</i>	1.94	1.03	Beta-galactosidase small subunit (EC 3.2.1.23) (Lactase).
x05301 01192	<i>dpo1</i>	1.90	1.63	DNA polymerase I (EC 2.7.7.7) (POL I).
x05301 00236	<i>y904; ym53; y663</i>	1.89	1.49	Hypothetical UPF0082 protein LJ0904.; Hypothetical UPF0082 protein
x05301 00647	<i>ldcC</i>	1.88	1.78	Arginine/lysine/ornithine decarboxylases
x05301 00587	<i>ushA</i>	1.88	2.84	5'-nucleotidase/2',3'-cyclic phosphodiesterase and related esterases

\* ペプチド非添加時をコントロールとしたときのペプチド添加時の転写量変化率

\*\* ペプチド添加後の時間



## 第4章 アミノ酸に応答する蛋白質分解系遺伝子の転写調節因子の解析

### 4.1. 緒言

第3章での検討で、*L. helveticus* CM4 株において、培地中のペプチド濃度に応じた蛋白質分解系遺伝子群の転写調節現象が確認された。そのことから、菌体内アミノ酸濃度に応答して転写を調節する働きをもつ因子の存在が示唆された。しかしながら、*L. helveticus* 種を含めた *Lactobacillus* 属において、アミノ酸濃度に応答した蛋白質分解系遺伝子転写調節因子やその機構は明らかとなっていない。

乳酸球菌である *L. lactis* 種では、CodY と呼ばれる転写調節因子が分岐鎖アミノ酸(BCAAs)に応答し、蛋白質分解系遺伝子の転写を調節することが明らかとなっている(13)。*L. lactis* 種や *Bacillus subtilis* 種などにおいて、転写調節因子 CodY は BCAAs と結合することによって DNA に対する親和性を高め、特に蛋白質分解系遺伝子群の転写調節領域に存在する結合領域(CodY-box)に直接結合することによって、その転写を抑制する(Belitsky & Sonenshein, 2008; den Hengst *et al.*, 2005b; Petranovic *et al.*, 2004)。*B. subtilis* 種においては、BCAAs 以外にも、細胞のエネルギー状態のマーカースとして考えられるグアノシン三リン酸(GTP)も CodY の DNA への結合を促進する補助因子として知られている(Blagova *et al.*, 2002; Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001)。

しかし、*L. helveticus* 種を含む *Lactobacillus* 属乳酸菌のゲノムには *codY* 遺伝子と相同性の高い遺伝子は見つからず、また、*L. helveticus* 種においてアミノ酸に応答する蛋白質分解系の転写調節因子に関する報告はこれまでにない。本検討では、*L. helveticus* 種においても、アミノ酸に応答し蛋白質分解系遺伝子の上流領域に結合する転写調節因子が存在すると仮説をたて、DNA ビーズを用いて、新規な転写調節因子の単離を試みた。さらに単離された DNA 結合蛋白質の性質を調べ、*L. helveticus* 種における蛋白質分解系遺伝子の転写調節機構を解明することを目指した。

### 4.2. 実験材料および方法

#### 4.2.1. DNA セファロースの調製

基本的な DNA 操作は Molecular cloning(Sambrook *et al.*, 1989)に従った。*L. helveticus* CM4 株の染色体 DNA を Leenhouts らの方法(Leenhouts *et al.*, 1990)に

従って、抽出した。3章での検討において *L. helveticus* CM4 株でペプチド添加により転写抑制が確認された蛋白質分解系遺伝子(*dppD*、*pepV*、*pepD*、*pepO2*、*pepO1* および *pepCE*)の上流領域の約 300bp の断片を調製するため、表 4.1 に示すプライマーを用いて PCR 増幅した。アビジンビーズと結合させることで DNA セファロース樹脂を作製するため、フォワードプライマーの 5'末端をビオチン化して用いた。6種類の PCR 断片とアビジンセファロース(Sigma Aldrich)を混合し DNA セファロースを調製した。

#### 4.2.2. DNA 結合蛋白質の単離

*L. helveticus* CM4 株を 1 L の MRS 培地(De Man *et al.*, 1960)において 37°C で培養した。菌体を 2,000 x g で 10 分間の遠心分離により回収し、10mL の 0.01M Tris-HCl, pH 7.9、0.1M NaCl、25 % (w/v) スクロースを含むバッファーで洗浄した。洗浄した菌体を 5ml のバッファー(0.3M Tris-HCl (pH 7.9)、0.1M EDTA)中に懸濁し、リゾチーム(4 mg/ml)とムラミダーゼ(1mg/ml)を加え 30°C で 1 時間保温し細胞壁を分解した。その後 25mL の 1M NaCl、0.02M EDTA、0.08% デオキシコール酸を含む pH7.0 の溶液を加え、細胞を破壊した。氷上で 10 分間保持後、破壊細胞液を 10,000rpm で 10 分間遠心分離した。得られた上清に 17%(w/v)ポリエチレングリコール 6000(PEG)、0.157M NaCl、2%のカザミノ酸(アミノ酸混合物)(BD)を含む 70mL の溶液を加え、染色体 DNA と DNA 結合蛋白質を共沈殿させた。得られた混合液を 10,000rpm で 10 分遠心分離し、沈殿を DNA-蛋白質複合体として回収した。沈殿を 5%PEG、2M NaCl、10mM Tris-HCl、pH7.9 の 10mL の溶液に懸濁し、DNA 結合蛋白質を溶解させた。10,000rpm、10 分で遠心分離し、上清を回収し、1L の TE バッファー(10mM Tris-HCl(pH7.0)、1mM EDTA)中で、4°C、20 時間、ヴィスキングチューブを用いて透析を行った。透析後の溶液に各 10mM の分岐鎖アミノ酸 (Val、Leu、Ile ; BCAAs) を加え、2mL の DNA セファロースカラムに通した。各 10mM の BCAAs を含む HEPES バッファー(20mM HEPES pH7.9、50mM KCl、0.2mM EDTA、0.5mM DDT、10%グリセロール、プロテアーゼインヒビターカクテル)を 5 倍量使用しカラムを洗浄した。その後、BCAAs が存在しない場合に DNA 結合性が減少する蛋白質を溶出させるため、BCAAs を含まない HEPES バッファーを用いて蛋白質を溶出した。溶出した溶液を 5-15%グラジエントゲルを用いて SDS-PAGE を行い、蛋白質を分離した。ゲル中の蛋白質を銀染色キット(和光純薬工業)を用いて染色した。

得られた蛋白質を同定するため、ゲルからバンドを切り出し、15mM フェリシア

ン化カリウム、50mM チオ硫酸ナトリウムを加えて脱色し、溶液を純水に置換し洗浄した。ゲル片を 100mM 炭酸水素アンモニウムに浸し 20 分間振とうし、溶液をアセトニトリルに置換し、ゲルが白色するまで脱水した。脱水したゲル片に  $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  のシークエンスグレードのトリプシンを含む 50mM の炭酸水素アンモニウムを加え  $37^\circ\text{C}$  16 時間静置した。5%TFA、50%アセトニトリルを加えペプチドを抽出し、質量分析装置に供した。Ultraflex TOF/TOF (BRUKWE DALTONICS)を用いて MS/MS イオンサーチ法で測定し、ソフトウェアとして MASCOT、データベースは NCBIInr を使用して解析した。

#### 4.2.3. 形質転換大腸菌からの CBS ドメイン蛋白質の精製

グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質を作製するため、CBS ドメイン蛋白質(CBSDP)遺伝子をプライマー-26kF、26kR(表 4.1)を用いて PCR 増幅した。増幅した PCR 断片とプラスミド pGEX5X-1(GE ヘルスケア)を *EcoRI*、*XhoI* で消化し、プラスミド pGEX5X-1 に CBSDP 遺伝子を挿入した。得られたプラスミドを大腸菌 HB101(タカラバイオ)に形質転換し、GST 融合 CBSDP 蛋白質の精製に用いた。キットに記載の方法に従い、HB101 株にて生産した GST 融合蛋白質をグルタチオンセファロースを用いて精製し、Factor Xa(GE ヘルスケア)で GST を切断し、CBSDP を精製した。形質転換大腸菌から精製した CBSDP は SDSPAGE を行い、精製を確認した。精製した蛋白質濃度をプロテインアッセイキット(バイオラド)を用いて BSA をスタンダードとして使用し、測定した。

#### 4.2.4. ゲルシフトアッセイと共通モチーフ解析

ゲルシフトアッセイは基本的には転写調節因子 CodY 蛋白質で報告のある方法 (den Hengst *et al.*, 2005b)に従った。6 種類の蛋白質分解系遺伝子(*pepV*, *pepO1*, *pepO2*, *pepT2*, *pepCE* および *dppD*)の上流領域約 300bp をそれぞれのプライマー(表 4.1)を用いて PCR 増幅しゲルシフトアッセイに用いた。精製した CBSDP と約 300bp の蛋白質分解系遺伝子上流領域の DNA 断片を混合した。DNA-蛋白質結合反応は、 $10 \mu\text{L}$  の結合バッファー(20mM Tris-HCl, pH8.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、100mM KCl、1mM ジチオスレイトール、0.01% BSA)中で、約 15ng の PCR 断片と 0~9  $\mu\text{M}$  の CBSDP と各 10mM の BCAAs もしくは各種アミノ酸(Val, Leu, Ile, Gly, His, Ser, Thr, Pro, Met)を混合して行った。混合後、室温で 10 分間保持し、5%ポリアクリルアミドゲル、TBE バッファーを用いて 120V で 30 分程度電気泳動し、エチジウムブロマイドで DNA を染色し、DNA バンドの移動を確かめた。*pepV* 遺伝子上流の短い 4 種のプロ

ープを、表 4.1 記載のプライマーを用いて増幅し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  と T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(TAKARA)を用いて、酵素のプロトコールに従い、5'末端を RI 標識した。ゲルシフトアッセイを上記の方法で行い、約 5,000cpm(約 0.3ng)のプロープを 1 レーンの電気泳動に用いた。 $^{32}\text{P}$  由来のシグナルを、X 線フィルム RX と増感紙(富士フィルム)を用いて検出した。

6 種類の蛋白質分解系遺伝子(*pepV*, *pepO1*, *pepO2*, *pepT2*, *pepCE* および *dppD*)の上流領域約 300bp を MEME 解析(Bailey & Elkan, 1994)し、共通モチーフを探索した。得られたモチーフを Weblogo website (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)を用いて視覚的に示した。

#### 4.2.5. 形質転換大腸菌での *pepV* 遺伝子転写抑制

*pepV* 遺伝子と DNA セファロースで精製・同定した *CBSDP(BCARR)* 遺伝子を ORF の上流 500bp、下流 300bp を含む断片として、PCR 増幅した。使用したプライマーを表 4.1 に記した。得られた PCR 断片を、プラスミド pBR322(タカラバイオ)の *EcoRI* / *BamHI* サイト、*EcoRI* / *SphI* サイトにそれぞれ挿入し、*pepV* 遺伝子のみを保持するプラスミド pBR-*pepV* と両遺伝子を保持するプラスミド pBR-*pepV*-CBS の 2 つのプラスミドを構築した(図 4.5A)。得られたプラスミドをそれぞれ大腸菌 HB101 株に形質転換した。形質転換大腸菌の *pepV* 遺伝子転写量は、逆転写(RT)定量 PCR 法で定量した。Light Cycler 480(ロシュ・ダイアグノスティクス)と One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II(タカラバイオ)を用いてキットのプロトコールに従い、転写量の定量を行った。大腸菌の遺伝子転写量の内部標準としてグリセルアルデヒド 3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(*GAPDH*)遺伝子を用いた。プライマーを表 4.1 に示す。プラスミド pBR-*pepV* もしくは pBR-*pepV*-CBS を保持する形質転換大腸菌を 0.4%カザミノ酸(BD)と各 10mM の BCAAs を含む M9 最少培地(Sambrook *et al.*, 1989)(+BCAAs)とアミノ酸を含まない培地(- BCAAs)に OD=0.6 となるように植菌し、M9 および M9+BCAAs 培地に植菌 1 時間後に菌体を回収し、全 RNA を抽出した。全 RNA 抽出には RNeasy mini kit(キアゲン)を使用し、操作は付属のプロトコールに従った。転写量解析には想定増幅効率を 2 として、内部標準遺伝子 *GAPDH* に対するの相対定量を行った(Pfaffl, 2001)。転写量は、pBR-*pepV* プラスミドを保持するコントロールに対する割合で示した。実験は 3 回実施し、Student's *t*-test で統計処理を実施した。

#### 4.2.6. DNase I フットプリント解析

精製 BCARR を用いた DNase I フットプリント解析は基本的に以前の報告に記載の方法に従った(den Hengst *et al.*, 2005b)。 *pepV* 上流領域 309bp を表 4.1 に記載のプライマー(pepVupF, pepVupR)を用いて PCR 増幅し、得られた増幅断片を  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP と T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(タカラバイオ)を用いて、5'-OH を  $^{32}\text{P}$  で RI ラベルした。片末端ラベルプローブを精製するため、RI ラベルプローブを制限酵素 *AfuI* で切断し、コーディング鎖の 5'末端を  $^{32}\text{P}$  ラベルした 290bp(スタートコドンから -266~+24)のプローブを調製した。DNA-蛋白質結合は、ゲルシフトアッセイと同様のバッファーを用い、約 3ng の  $^{32}\text{P}$  片末端ラベルプローブ(約 100,000cpm)と 0、2.3 および 18  $\mu\text{M}$  の BCARR 蛋白質をそれぞれ加えて、室温、10 分インキュベートした。その後、反応液に 0.125unit の DNaseI(タカラバイオ)を加え 1.5 分 37 度で DNA を分解し、フェノール/クロロホルムを添加し反応を停止し、その後水相をエタノール沈殿した。エタノール沈殿した DNA をローディングバッファー(95%脱イオン化ホルムアミド、0.025%SDS、0.025%ブromoフェノールブルー、0.025%キシレンシアンール、0.5mmol/L EDTA)に溶解し、100°C3 分処理後急冷し、8M の尿素を含む 5%ポリアクリルアミドゲルと TBE バッファーを用いて泳動した。 $^{32}\text{P}$  のシグナルは、X 線フィルム RX と増感紙(富士フィルム)を用いて検出した。A+G ラダーは、マキサムギルバートの方法で調製した(Liu & Hong, 1998)。

#### 4.2.7. BCARR の C 末端の類似性解析

235 アミノ酸残基からなる BCARR の C 末端配列(120~235 アミノ酸)と類似性がある蛋白質を公開されているデータベースから検索した。Position-Specific Iterated (PSI)-BLAST を使用し、繰り返し BLAST 解析し、命名されている蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質の類似性を持つ領域を ClustalW を用いてアライメントし、ACT ドメインの過去の報告 (Aravind & Koonin, 1999; Grant, 2006)の方法に従い、各アミノ酸をグループ化し色分けして示した。

#### 4.2.8. BCARR の相同蛋白質の系統樹解析

BCARR の相同蛋白質を BLASTP を用いて検索し(e-value<10<sup>-50</sup>)、clustalW を用いて系統樹を作成し、Unrooted phylogenetic tree with branche lengrh (N-J)法を用いて作図した。系統樹を単純化するため、各属から 1 種を選択して記載した。*Lactobacillus* 属からは、各 subgroup から 1 種を選択し、*L. helveticus* 種を含む *delbruekii* subgroup からは 4 種を選択して記載した。*Lactobacillus* 属の subgroup

分類は過去の報告に従った(Felis & Dellaglio, 2007)。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. DNA 結合蛋白質の分離・同定

3章において、乳培地における *L. helveticus* CM4 株培養時にペプチド添加により転写量が抑制された蛋白質分解系遺伝子上流領域に結合する蛋白質の単離・同定を試みた。まず、DNA 結合蛋白質を疎分画して回収するため、菌体破砕液にポリエチレングリコール 6000 を加え、ゲノム DNA と結合する蛋白質を DNA と共沈殿させた。共沈殿を行う際、アミノ酸濃度が高い状態でのみ DNA 結合能が高まる蛋白質を沈殿させるため、アミノ酸の混合物としてカザミノ酸を加えて沈殿を行った。共沈殿した蛋白質を 1M の NaCl で DNA から遊離させて、その後、分岐鎖アミノ酸濃度依存的に DNA に結合する蛋白質を単離するため、3 種の分岐鎖アミノ酸(BCAAs)を添加し DNA セファロースに供した。DNA セファロースには、3 章において *L. helveticus* CM4 株でペプチドの添加により転写が低下する 6 遺伝子(*pepV*, *pepO1*, *pepO2*, *pepT2*, *pepCE* および *dppD*)の上流約 300bp を結合し、BCAAs 濃度が高い状態で上記 6 種の遺伝子上流領域に結合する蛋白質の濃縮を行った。その後、BCAAs を含まないバッファーで溶出を行い、BCAAs 濃度依存的に DNA に結合する蛋白質を探索した。BCAAs を含まないバッファーでの溶出液を SDS-PAGE 解析した結果、24、26 および 67kDa の蛋白質のバンドが確認された(図 4.1A)。バンドの切り出し、MS 分析と Mascot 検索の結果、67kDa の蛋白質はプロリル-tRNA シンターゼと同定され、24kDa と 26kDa の蛋白質は同一の蛋白質で、N 末端にシスタチオニン β-シンターゼ ドメイン ペア (cystathionine β-synthase domain pair :CBS pair)という保存された構造をもつ機能未知の蛋白質と同定された(図 4.1B)。CBS ドメインの名前の由来となった酵素である CBS はホモシステインとセリンからシスタチオニン合成する。しかし、CBS ドメインを取り除いた組み換え CBS 酵素もその酵素活性を有する(Ignoul & Eggermont, 2005)ことから、CBS ドメインは酵素の活性中心ではないことが明らかとなっている。文献調査の結果、67kDa の prolyl-tRNA synthase は DNA への結合を示唆する情報は見つからなかった。一方で、CBS pair を有する蛋白質は、*Methanocaldococcus jannaschii* において E-box と呼ばれる DNA 配列に結合するという報告があった(Aguado-Llera *et al.*, 2010)ことから、本検討で単離された 26kDa の CBS ドメイン蛋白質(CBSDP)は、BCAAs 濃度依存的に 6 種類の蛋白質分

解系遺伝子の上流のいずれかに結合する蛋白質である可能性が考えられた。

#### 4.3.2. CBS ドメイン蛋白質の DNA への結合(ゲルシフトアッセイ)

CBS ドメイン蛋白質(CBSDP)の DNA 結合性を評価するため、形質転換大腸菌でグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質として CM4 株の *CBSDP* 遺伝子が大腸菌で発現させグルタチオンカラムで融合蛋白質を特異的にトラップし、Factor Xa で GST の末端を切断し、CBSDP を溶出・精製した(図 4.2)。精製した CBSDP と約 300bp の *pepV* および *pepO2* 遺伝子の上流領域を用いて、ゲルシフトアッセイを行い、DNA と CBSDP の結合性を評価した。CBSDP の濃度依存的にどちらの DNA プローブもシフトした。*pepV* プローブでは 3  $\mu$  M の CBSDP 濃度で DNA バンドのシフトが確認された。各 10mM の分岐鎖アミノ酸(Val, Leu, Ile; BCAAs)を添加した場合、1.5  $\mu$  M の CBSDP 濃度でも、不完全ながら DNA バンドのシフトが確認された(図 4.3)。*pepO2* プローブにおいても同様の CBSDP 濃度でバンドのシフトが観察され、シフトする DNA 量とシフト幅は BCAAs 添加によって促進された。BCAAs によって CBSDP の *pepV*、*pepO2* 上流領域への結合が促進されることが示された。シフトしたバンドが広域であることや、BCAAs や蛋白質の増加に伴い、シフト幅が増加することから、複数の CBSDP が 1 つのプローブに結合していることが示された。

3 種類の BCAAs 混合物による CBSDP の DNA 結合への効果が確認できたため、1 種類のアミノ酸での効果を確認した。3 種類の BCAAs はどれも単独で CBSDP の DNA 結合を促進したが、中でも Ile の効果が最も大きかった(図 4.4)。BCAAs 以外の検討に用いたアミノ酸(Gly, His, Ser, Thr, Pro および Met)では CBSDP の DNA 結合への効果は確認されなかった。

#### 4.3.3 形質転換大腸菌での CBS ドメイン蛋白質の転写調節

*L. helveticus* 種は一般的に形質転換効率が極めて低く、遺伝子欠損が困難であるため、*CBSDP* 遺伝子および蛋白質分解系遺伝子 *pepV* を形質転換にて導入した大腸菌を用いて、定量 RT-PCR によって *pepV* の転写量測定を行うことでアミノ酸による転写量の比較評価を行った。*pepV* 遺伝子を自身のプロモーターで転写させるため、*pepV* 遺伝子をその上流 500bp を含むようにプラスミド pBR322 に連結した(pBR-*pepV*)。さらに、*pepV* と *CBSDP* 遺伝子を共発現させるため、両遺伝子を挿入したプラスミド pBR-*pepV*-CBS を構築し、両プラスミドを大腸菌に導入した(図 4.5A)。M9 最少培地で培養した 2 種の形質転換大腸菌株の *pepV* 転写量に変化はなかった。

一方で、M9 最少培地に 0.4%カザミノ酸および 10mM の BCAAs を添加した培地では、CBSDP を共発現する pBR-pepV-CBS を導入した大腸菌では、CBSDP 遺伝子を含まない pBR-pepV 保持大腸菌と比較して、*pepV* 転写量が有意に ( $0.001 < p$ )、73%に低下した(図 4.5B)。この低下の割合は小さいが、第 3 章で示したペプチド添加によって *L. helveticus* CM4 株の *pepV* の転写量の低下の割合も 73%で同程度であった(表 3.1)。これらの結果から、BCAAs およびカザミノ酸を含む培地では、大腸菌内で発現した CBSDP が *pepV* 転写を抑制した可能性が示された。ゲルシフトアッセイの結果も加えて考えると、CBSDP が菌体内に取り込まれた BCAAs 濃度の上昇を感知し、*pepV* 上流領域に結合し、RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合を阻害することで、*pepV* 遺伝子の転写を低下させた可能性が考えられる。以上のことから、本検討で同定された 26 k Da の CBSDP は、BCAAs 濃度を感知する、蛋白質分解系遺伝子群の新規な転写調節因子である可能性が示された。この機能から、本検討において単離された 26kDa の CBSDP を分岐鎖アミノ酸応答性転写調節因子(Branched Chain Amino Acid Responsive Transcriptional Regulator; BCARR)と名づけ、その遺伝子を *bcaR* として DDBJ に登録した(Accession No. 812553)。

#### 4.3.4. DNA モチーフ解析

*pepV* および *pepO2* 遺伝子上流 DNA への CBSDP (=BCARR) の結合が確認できたため、3 章でペプチド添加によって転写が低下した他の蛋白質分解系遺伝子 (*pepO1*, *pepT2*, *pepCE* および *dppD*) の上流 DNA に BCARR が結合するかどうかの確認を行った。試験に用いた 5 種の遺伝子上流領域の DNA バンドは *pepV* と同様に、BCAAs の存在下で移動度が低下した(図 4.6A)。以上の結果から、本検討で同定した BCARR は BCAAs の存在時に蛋白質分解系遺伝子上流領域に結合することが示された。

BCARR が結合する特異的な DNA モチーフを探索するため、MEME 解析法を用いて 6 種の蛋白質分解系遺伝子上流領域から共通モチーフを探索した。その結果、AT 豊富なパリンδροーム配列を含む共通モチーフ、5'-AAAAANNCTWTTATT-3'が確認された(図 4.6B)。

#### 4.3.5. BCARR 蛋白質の結合 DNA 領域の推定

*pepV* 遺伝子上流領域のどの部分に BCARR が結合するかを確かめるため、図 4.3B で使用した 309bp の DNA プローブを断片化し、100~140bp の 4 種類のプローブを作成し、ゲルシフトアッセイを行った(図 4.7)。10mM BCAAs 存在下において、



BCARR を添加すると-136/+4 プローブは元のバンドの全てのシグナルがシフトし、2つのシフトバンドがみられた。しかし、それ以外の3種類のプローブでは、シグナルが弱く移動度が小さいシフトバンドが1つ確認できたが、元のバンドの方が濃く残っていた(図 4.7A)。これらの結果から、BCARR は *pepV* 上流領域のなかでも-136/+4 プローブへの結合能が高いことが示された。さらに、重複した配列を含む両隣のプローブ、-216/-116 プローブと-76/+43 プローブのシフトが弱いことから、両プローブと重複しない領域である-116~-76bp(スタートコドンからの塩基数)が BCARR と結合能が高い DNA 領域であると考えられた。加えて、図 4.5B に示した6種類に共通するモチーフは-91~-77bp に位置し、BCARR との結合能が高いと考えられる領域に含まれていた。以上のことから、BCARR は6種の遺伝子上流領域の共通モチーフとして検出されたモチーフに結合していると推定された。

#### 4.3.6. DNase I フットプリント解析による DNA 結合領域の推定

*pepV* 遺伝子上流領域のどの部分に BCARR が結合するかを確かめるため、DNase I フットプリント解析を実施した。*pepV* 上流領域の 290bp のコーディング鎖 5'末端の片末端 <sup>32</sup>P ラベルプローブ(スタートコドンから-265bp~+24bp)と、0, 2.3 および 18  $\mu$  M の BCARR を用いてフットプリント解析を実施した。BCARR を含まないレーンに比べ、BCARR を含むレーンでは、約 195bp の領域が DNase 消化から保護され、バンドが薄くなった(図 4.8A)。BCARR の濃度を 2.3  $\mu$  M から 18  $\mu$  M に増加するとその保護領域のバンドはより薄くなり、一部消失した。その保護作用は、約-131~+24bp(スタートコドンから)で強かった。DNase 消化から保護された領域は、スタートコドンから約-170~+24bp で、推定 BCARR 結合領域(BCARR-box)と推定プロモーター領域(-35、-10 領域)を含んでいた(図 4.8B)。これらの結果から、BCARR の BCARR-box への結合の可能性が強く示唆された。さらに、BCARR による保護領域がプロモーター領域を含むことから、BCARR 結合がプロモーター領域を覆うことによって RNA ポリメラーゼの結合を阻害する可能性が示された。

#### 4.3.7. BCARR 蛋白質のドメイン機能推定

BCARR 蛋白質のドメイン構造を考察するため、蛋白質配列の類似性検索を行った。図 4.1 に示したように、BCARR 蛋白質全体配列に対する BLAST での conserved domain search(Marchler-Bauer *et al.*, 2011)の結果、N 末端は CBS pair 構造が保存されていたが(図 4.1)、C 末端には保存されたドメインが見つからなかった。そこで、C 末端(131-235aa)と同一性が低い類似性のある蛋白質の検索を試みた。

Position-Specific Iterated (PSI)-BLAST を用いて、より感度の高い類似性検索をした。検索結果から蛋白質名がつけられた配列を取り出し、BCARR 蛋白質 C 末端と類似性がある領域を確認すると、類似性がある全ての領域に、ACT ドメインが存在した(図 4.9A)。BCARR の C 末端と図 4.9 のスレオニンデヒドロゲナーゼ(threonine dehydrogenase; TDH)の ACT ドメインの類似性は、identity 19%、positive 44%で、他の 3 種類の蛋白質と BCARR の類似性も同様な値であった。ACT ドメインは、3 つの酵素 (Aspartate kinase、Chorismate mutase、TyrA (prephenate dehydrogenase))の頭文字から名づけられており、アミノ酸結合ドメインとして、アミノ酸代謝にかかわる酵素や輸送担体、転写調節因子などに保存されているドメインであった(Chipman & Shaanan, 2001; Ettema *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2011)。また、各蛋白質の類似領域のアライメントを ClustalW を用いて作成し、Grant *et al.*と Aravind and Koonin の方法(Aravind & Koonin, 1999; Grant, 2006)で各アミノ酸残基をタイプ別に色づけすると(図 4.9B)、アミノ酸配列の同一性は低いものの、リガンド結合サイトに保存されるグリシンが全ての蛋白質で保存され(図 4.9B)、各タイプ別のアミノ酸残基の並び方がよく保存されており、類似性が確認できた。以上の結果から、BCARR 蛋白質の C 末端は ACT ドメインと類似性があることが明らかとなり、ACT ドメインの機能としてアミノ酸結合に関与する可能性が示された。これらの結果から推察すると、BCARR 蛋白質は C 末端の ACT ドメインで BCAAs と結合し認識することで、N 末端の CBS pair 構造で蛋白質分解系遺伝子のプロモーター領域に存在する特異的 DNA 配列に結合しやすくなり、その結果、標的の遺伝子の転写を抑制すると考えられる。

#### 4.3.8. BCARR の相同蛋白質の系統樹解析

*L. helveticus* CM4 株の BCARR の相同蛋白質を探索した。BLASTP 解析の結果、 $e\text{-valu}<10^{-50}$  で類似性が確認された蛋白質は、*L. helveticus* 種を含む lactobacillaceae 科のゲノムによく保存されていた。さらに、enterococcaceae 科、leuconostocaceae 科、listeriaceae 科、exiguobacteria 属、bacillaceae 科(*Bacillus selenitireducens* の 1 種)に存在していた(図 4.10)。

#### 4.4. 考察

菌体内のアミノ酸濃度に応答し、蛋白質分解系遺伝子の転写を制御する CodY 蛋白質とその応答配列が *L. lactis* 種 (den Hengst *et al.*, 2005b; Guédon *et al.*, 2001)

や *Bacillus subtilis* 種 (Blagova *et al.*, 2002)、*Streptococcus thermophilus* 種 (Liu *et al.*, 2009)、*Streptococcus pneumoniae* 種 (Hendriksen *et al.*, 2008)、*Streptococcus mutans* 種 (Lemos *et al.*, 2008)、*Oenococcus oeni* 種 (Ritt *et al.*, 2009) で報告されている。3章では、*L. helveticus* CM4 株の乳内での発酵において、ペプチド混合物の乳への添加によって蛋白質分解系遺伝子の転写抑制および血圧降下ペプチド、VPP、IPP の産生の低下が観察された。蛋白質分解系遺伝子の転写抑制メカニズムを解明するため、まず *codY* 遺伝子の相同配列を *L. helveticus* CM4 株と他の *Lactobacillus* 属のゲノム配列から探索したが、*codY* の相同配列は *Lactobacillus* 属のゲノム配列には見つからなかった。

本検討では、ペプチドやアミノ酸濃度に応答した蛋白質分解系遺伝子の転写調節に関わる因子を同定するため、分岐鎖アミノ酸(BCAAs)存在下で転写調節領域の DNA に結合し、BCAAs 非存在下で DNA への結合能が弱まる蛋白質が存在すると仮定し、蛋白質分解系遺伝子上流領域を結合した DNA セファロースを用いて探索した。その結果得られた 26kDa の CBS ドメイン蛋白質(CBSDP)が、蛋白質分解系遺伝子上流領域へ結合すること、その結合は BCAAs の存在によって促進されることを確認した。次に、形質転換大腸菌内での *pepV* 遺伝子の転写は、CBSDP を共発現する株においてのみ、BCAAs とカザミノ酸の添加によって抑制されることを確認した。形質転換大腸菌内における *pepV* 転写量の抑制率は 27%と大きくはなかったが、2%のペプチド混合物を添加した乳発酵中の *L. helveticus* CM4 株の *pepV* 転写量抑制率と同等であった(27%)ことから、大腸菌内でも CBSDP の発現により BCAA を感知して、*L. helveticus* 内と同程度に、*pepV* 遺伝子の転写を抑制したと考えられる。以上の結果より、同定した新規の 26kDa の CBSDP が BCAAs 濃度に応答し、蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制する分岐鎖アミノ酸応答転写調節因子(Branched Chain Amino Acid Responsive Transcriptional Regulator; BCARR)と考えられた。この BCARR によって、蛋白質分解系遺伝子群が負のフィードバック制御を受けることによって、窒素源としてのアミノ酸の獲得状況に応じた蛋白質分解系遺伝子群の過剰な発現を制御し、効率よく発現制御されていると考えられる。BCARR 蛋白質による蛋白質分解系遺伝子の転写抑制の結果として、蛋白質分解系の活性が低下し、血圧降下ペプチドの産生も低下する可能性が示された。

本検討で新規転写調節因子として同定された 26kDa の CBS ドメイン蛋白質(CBSDP=BCARR)は、その N 末端に CBS pair を、C 末端に ACT ドメインを有して

いた(図 4.9A)。しかしながら、転写調節因子の DNA 結合ドメインとして知られる既知の構造は、BLAST での conserved domain search(Marchler-Bauer *et al.*, 2011)や PSI-BLAST の結果からは検出されなかった。まず CBS pair について記載し、のちに ACT ドメインについて記載する。

CBS pair は 2 つの CBS ドメインがタンデムに並んだ構造をしている。CBS ドメインは、多くの生物種で、代謝酵素やトランスポーターといったさまざまな機能を持った蛋白質に分布している。CBS ドメインの名前の由来となった酵素であるシスタチオニンβシンターゼ(CBS)はホモシステインとセリンからシスタチオニンを合成する。しかし、CBS ドメインを取り除いた組み換え CBS 酵素もその酵素活性を有する(Ignoul & Eggermont, 2005)ことから、CBS ドメインは酵素の活性中心ではないことが明らかとなっている。CBS ドメインを含む酵素である CBS 酵素やイノシン 5'-モノホスフェートデヒドロゲナーゼやトランスポーターOpuA での CBS ドメインの機能は、S-アデノシルメチオニンや ATP といったリガンドと結合し濃度を感知したり、イオン濃度を感知し、蛋白質の構造変化によって自身の蛋白質活性を調節していると推察されている(Baykov *et al.*, 2011; Ignoul & Eggermont, 2005)。

上記のように CBS ドメインはリガンド認識や活性調節機能をもったドメインと考察されているが、DNA 結合性を示す報告も存在する。*Methanocaldococcus jannaschii* の CBS ドメインを有する MJ0729 蛋白質が DNA へ結合するという報告がある(Aguado-Llera *et al.*, 2010)。MJ0729 蛋白質はその蛋白質のほぼ全てが CBS pair 構造で占められているため、CBS ドメインが DNA へ結合する可能性が示唆されている。これらのことから、本検討で同定された BCARR においても CBS pair を介して DNA へ結合している可能性が考えられた。

次に、本検討で同定された BCARR の C 末端と類似性が確認された ACT ドメインについては、以下のような報告がある。ACT ドメインは古細菌や細菌において、酵素やトランスポーター、転写調節因子などに広く保存されたドメインである(Grant, 2006)。ACT ドメインを含む蛋白質において、ACT ドメインは、多くの場合アミノ酸を認識し、結合性を示す。また報告は少ないが、金属イオンとも結合すると報告されている。ACT ドメインはアミノ酸のような小さな分子を感知し結合することで、自身の蛋白質構造を安定化し、自身の蛋白質の活性を調節すると考えられている。これらのことから、本検討で同定された BCARR は、その C 末端の ACT ドメイン様配列で BCAAs と結合し、その N 末端の CBS pair で DNA に結合している可能性が考え

られた。また、BCARR の DNA ビーズを用いた単離、およびゲルシフトアッセイに各 10mM の BCAAs を用いたが、ゲルシフトアッセイにおいては、各 2.5mM から DNA 結合促進効果を確認している(データ未掲載)。本検討では菌体内の BCAAs 濃度は未測定だが、*L. lactis* 種では培地へのカゼイン由来ペプチド混合物のカジトンの添加によって、菌体内 BCAAs 濃度が約 8.5mM になると報告がある(Petranovic *et al.*, 2004)。BCARR が 2.5~10mM の BCAAs 濃度を認識することは、菌体内 BCAAs 濃度から考えても妥当である。また、BCARR の DNA 結合促進効果は、3 種の BCAAs の中でも Ile が最も大きかった。*L. helveticus* 種の乳酸菌は BCAAs を含む多くのアミノ酸に対し要求性をしめすが(Kunji *et al.*, 1996)、そのなかで BCAAs、特に Ile を感知することで効率よくアミノ酸の獲得状況を把握していると考えられる。

BCARR の結合が確認された 6 種類の遺伝子上流領域の配列から共通モチーフを検索し、AT 豊富な、パリンドローム配列を含む DNA 配列、5'-AAAAANNCTWTTATT-3'を BCARR 結合モチーフ候補(BCARR-box)として推定した。実際に精製 BCARR と *pepV* 上流配列を短断片化したプローブを用いたゲルシフトアッセイによって結合領域の探索の結果、推定された DNA モチーフ(開始コドンから-91~-77bp)は、BCARR の結合性が高い領域(-116~-76bp)に含まれていた(図 4.7)。加えて、DNA フットプリント解析の結果、BCARR の添加によって *pepV* 上流領域の推定モチーフ BCARR-box を含む領域を DNase 消化から保護した(図 4.8)。これらの結果は推定された共通モチーフが、BCARR の結合モチーフである可能性を示唆している。さらに、*pepV* 上流領域の BCARR-box は推定プロモーター領域(-35、-10 配列の間)に位置していることから(図 4.8)、BCARR の BCARR-box への結合が、RNA ポリメラーゼのプロモーター配列への結合を阻害している可能性が推察された。BCARR の結合および BCARR-box の存在が確認された 6 種のプローブのうち、*pepO1*、*pepCE* の上流領域に存在する BCARR-box はスタートコドンからの距離が離れているが、*pepV* 上流領域を用いたフットプリントアッセイの結果(図 4.8)、広範囲の DNA と BCARR が相互作用する可能性が示されていることから、*pepO1*、*pepCE* の上流領域においても BCARR が BCARR-box 近傍を広範囲でカバーすることによって転写抑制する可能性は十分に考えられる。

ゲルシフトアッセイでシフトバンドが広くブロードであり、また BCARR の増加に伴い、そのシフト幅が広がることから(図 4.3、図 4.4、図 4.6)、1 分子の DNA プローブに複数分子の BCARR が結合していることが考えられる。DNA フットプリント

の結果からは、BCARR によって広範囲(約 195bp)にわたって DNase 消化が保護されることが明らかとなり、この結果からも複数分子の BCARR が DNA プローブへ結合することが示唆された。図 4.7 に示した短断片化した *pepV* 上流プローブを用いた実験では、同じ BCARR 濃度において、推定結合モチーフ(BCARR-box)を含むプローブ(図 4.7、-136/+4 プローブ)のみで、より高い位置へのバンドシフトが確認できたことから、結合能が高い DNA 配列にはより多くの BCARR 蛋白質が結合することが考えられる。一方で CBS pair をもつ他の蛋白質が多量体化を示すことが報告されており(Baykov *et al.*, 2011)、特異的な DNA 配列と結合した BCARR が多量体化を促進する可能性が考えられた。BCARR の DNA への結合様式をより詳しく理解するためには、推定 BCARR-box を欠損したプローブを用いたゲルシフトアッセイや、BCARR の多量体化の検証が必要である。さらに、*L. helveticus* 菌体内では他の蛋白質などが相互作用している可能性も考えられる。DNA セファロースを用いて BCAAs 濃度依存的に DNA 結合能を有する DNA 結合蛋白質として、26kDa の CBSDP(=BCARR) を単離したが、同時に 67kDa の蛋白質(プロリル-tRNA シンターゼ)が同定された。67kDa の蛋白質が DNA 結合能を有するかは未確認のままであるが、文献情報からは、67kDa の蛋白質(プロリル-tRNA シンターゼ)は DNA に結合しないと考えられる。加えて、26kDa の BCARR と 67kDa 蛋白質の溶出プロファイルが似ていることから、67kDa 蛋白質が 26kDa の BCARR との結合能を有する可能性も考えられるが、まだ確認できていない。今後、67 k Da 蛋白質を含め BCARR と結合する蛋白質の探索も必要となると考えられる。加えて、BCARR 遺伝子を欠損した *L. helveticus* 株を作成し、その転写を網羅的に解析することは、BCARR の転写調節機能をさらに理解する上で必要になると考えられる。

*L. lactis* 種において、BCAAs を感知し蛋白質分解系遺伝子の転写を調節すると報告がある *L. lactis* 種の CodY 蛋白質と、本検討で同定した BCARR とを比較すると、蛋白質の相同性もドメイン構造の類似性も低かった(図 4.11)。BCARR は N 末端の CBS pair 構造で DNA への結合、C 末端の推定 ACT ドメインで BCAAs の結合認識を行っていると考えられたが、CodY は N 末端の GAF-like ドメインで BCAAs と結合し、C 末端のヘリックスターンヘリックス(HTH)ドメインで DNA と結合することが報告されている(Levdikov *et al.*, 2006)。また、推定 BCARR 結合モチーフは、CodY 転写調節因子の結合モチーフである codY-box(5'-AATTTTCWGAAAATT-3')とは類似性がなかった(図 4.11)。*L. lactis* 種の CodY 蛋白質と BCARR 蛋白質の機能面での類

似性はいくつか存在する。ゲルシフトアッセイにおいて、DNA-蛋白質複合体を形成するための補助活性化因子として、どちらの蛋白質でも BCAAs を認識し、かつ BCAAs のなかでも Ile の効果が一番強い(図 4.4)(den Hengst *et al.*, 2005a)。また、活性化する BCAAs の濃度も CodY で 5mM(den Hengst *et al.*, 2005a)、BCARR で 2.5mM と非常に近い(データ未掲載)。また、ゲルシフトアッセイの結果から 1 つの DNA プローブに対して 1 分子以上の BCARR が結合していると推察できるが、同様のことが CodY についても推察されている。CodY 蛋白質では、蛋白質の 2(多)量体化や、CodY 蛋白質や BCAAs 濃度が高い場合には、CodY 蛋白質が codY-box への結合後、近傍の結合能の低い DNA サイトへ結合する可能性が原因として推察されており、BCARR でも推定結合モチーフをもたない DNA プローブへの弱い結合が図 4.7 で確認されていることから、CodY と同様に結合モチーフの近傍の結合能の低いサイトに BCARR が結合していた可能性が考えられる。

興味深いことに、本検討で初めて機能解析が行われた BCARR の相同遺伝子 ( $e\text{-valu} < 10^{-50}$ )は、Lactobacillaceae 科、Enterococcaceae 科、Leuconostocaceae 科、Carnobacteriaceae 科、Listeriaceae 科、Exiguobacterium 科、Bacillaceae 科 (*Bacillus selenitireducens* 種のみ)の科のゲノムに存在していた(図 4.10)。そのなかで、Bacillaceae 科や Enterococcus 科、Listerium 科のゲノムには *codY* の相同遺伝子が存在していた( $e\text{-valu} < 10^{-50}$ )。一方で、*Lactococcus* 属を含む Streptococcaceae 科のゲノムには *codY* の相同遺伝子のみ存在していた。CodY と BCARR という同様の機能を持った蛋白質を両方もつ微生物内での両蛋白質の機能がどのように関与しているかの研究は、興味深く、今後の検討課題である。

*L. helveticus* CM4 株において、推察される蛋白質分解系の発現制御システムと切り出される血圧降下ペプチド、VPP、IPP の産生について図 4.12 に模式的にまとめる。(I)最初に菌体外結合プロテイナーゼによって乳中の主要な蛋白質であるカゼインをオリゴペプチドに切断する。(II)切断されたオリゴペプチドはオリゴペプチドトランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、(III)菌体内の多くのペプチダーゼによってアミノ酸まで分解され利用される。特に VPP、IPP の前駆ペプチドは、エンドペプチダーゼ(PepO1、PepO2、PepT2 など)、アミノペプチダーゼ(PepCE など)、X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase(PepX)などによって分解され、VPP、IPP が切り出される。菌体内でのペプチド分解の過程で切り出されるアミノ酸は菌体によって利用されるが、(IV)アミノ酸濃度、特に BCAAs 濃度が上昇すると 26kDa の BCARR と結合す

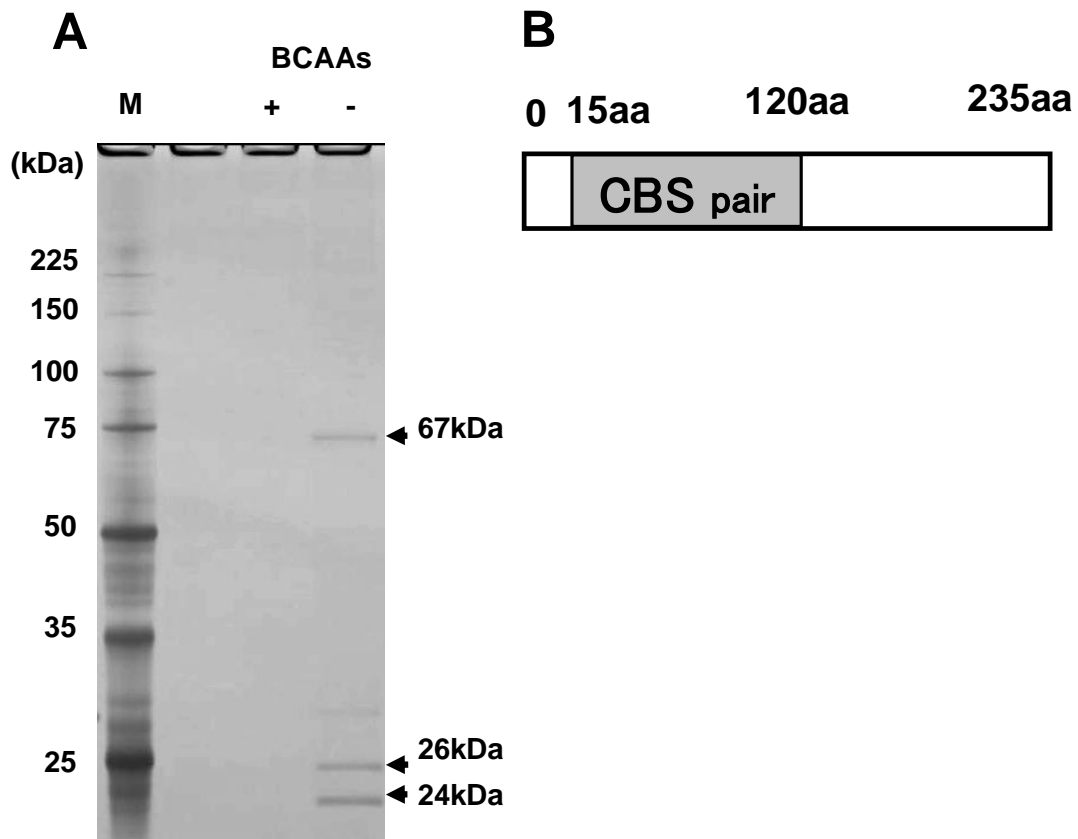
る。(V)BCAAs と結合した BCARR は、蛋白質分解系遺伝子上流に結合し蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制する。(VI)その結果、蛋白質分解活性が負のフィードバックを受け抑制され、蛋白質分解系の過度の発現を抑えることで効率よく発現制御している。その結果として VPP、IPP の産生も抑制される。このように、*L. helveticus* CM4 株において、菌体内アミノ酸濃度に応じた効率的な蛋白質分解系遺伝子群の発現が転写レベルで制御されていることが示され、その転写調節に関与する因子が本研究において始めて明らかにされた。この蛋白質分解系の活性制御機構が機能する結果、血圧降下ペプチドの産生抑制が引き起こされると考えられた。この蛋白質分解系の転写制御機構の解明により、BCARR 欠損株がより高い蛋白質分解活性を保持し、その結果、血圧降下ペプチドをはじめとする機能性ペプチドを高濃度で産生できる可能性が示唆された。



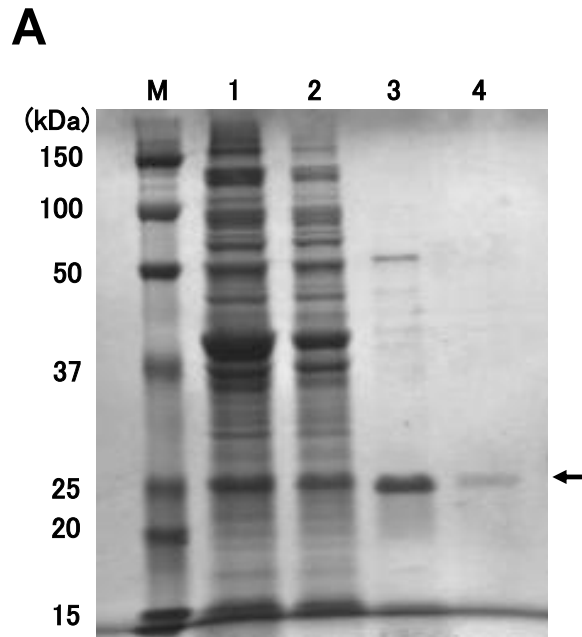
表 4.1 使用したプライマー

実験	プライマー	配列(5'-3')	
DNAビーズ作成、およびEMSA *	dppDupF	AACTTGAAGATGAATTTGGC	
	dppDupR	CTAGTAATAGATCACTCTGC	
	pepVupF	TCCATCCTATCGCTTAAAGG	
	pepVupR	TCATCTTTTTTAGCAGCAGC	
	pepDupF	GCTACAAACATTGTGTCAGC	
	pepDupR	CTTGCTCGTAACTTAAATCG	
	pepO2upF	CCGTCAGCATCAACAGTTGC	
	pepO2upR	CGCGGATTTTTGCTAAATTC	
	pepOupF	CAGCTTCATAGATTTTATGC	
	pepOupR	ATATAGCGCTTCTTTTCTG	
	pepCEupF	CCACTGTTCCAGTTTTTCATC	
	pepCEupR	TTCTTGTCGGCATGGTATCC	
	64 pepV遺伝子上流を断片化した短いプローブを用いたEMSA	pepV <sub>-266/-166</sub> F	TCCATCCTATCGCTTAAAGG
		pepV <sub>-266/-166</sub> R	AGAGCAACCATGCATCGAAA
pepV <sub>-216/-116</sub> F		GAGTCCTATCAAACATATA	
pepV <sub>-216/-116</sub> R		ATGTACAGTTGATCTTGGAA	
pepV <sub>-136/+4</sub> F		TTTCAAGATCAACTGTACATTCATGATAGT	
pepV <sub>-136/+4</sub> R		TTCATATATTTCTCTCCCTT	
pepV <sub>-76/+43</sub> F		GTATCTTATTTTTAGTAAGAATCAAACATT	
pepV <sub>-76/+43</sub> R		TCATCTTTTTTAGCAGCAGC	
GST融合蛋白質発現	26kF	GGAGGCGAATTCATGCTTATTAATCTTTAGTC	
	26kR	ATTGCAGGGTATTTAACTCGAGCACCCTACAATTC	
大腸菌での転写量解析のためのプラスミド調製	pepVexF	GTATTCGGATCCAGTTGCTTCTGCTTTTGC	
	pepVexR	AAGGGAATCCATGGATGATGGTTTAAATGG	
	26kexF	CGGGATCCGTAAGTCTTCCAGCAATGATCGC	
	26kexR	GTTGAGCATGCCAACAAGGAATTTGCTGTG	
転写量解析のためのリアルタイムPCR	pepVRTF	AAGGACAATATCCGTTACCC	
	pepVRTR	GAACGTAGTGAGGTTCTTCG	
	gapRTF	GTTACGCTACTACCGCTAC	
	gapRTR	ACCTACAGCTTTAGCAGCAC	

\* DNAビーズ調製時は、フォワードプライマー(-F)の5'末端をビオチン化して用いた。



**図 4.1 DNAセファロースによる *L. helveticus* CM4株DNA結合性蛋白質の精製と同定** (A) 精製蛋白質の5-15%SDSPAGE。CM4株の菌体抽出液を6種の蛋白質分解系遺伝子の上流領域を結合したビーズに10mM分岐鎖アミノ酸(BCAAs; +)存在下で結合させ、BCAAs非添加(-)バッファーで溶出した。67、26、24kDaのバンドから蛋白質を抽出し、LC-MSMS分析によって蛋白質を同定した。(B) 26kDaの蛋白質のドメイン構造の模式図。26kDa蛋白質のN末端に認められたCystathionine  $\beta$  -synthase domain pair (CBS pair)と呼ばれる構造をCBSとして示した。



**B**

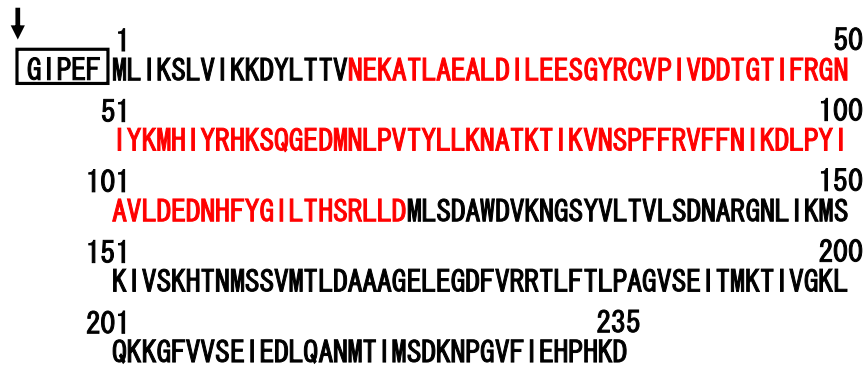
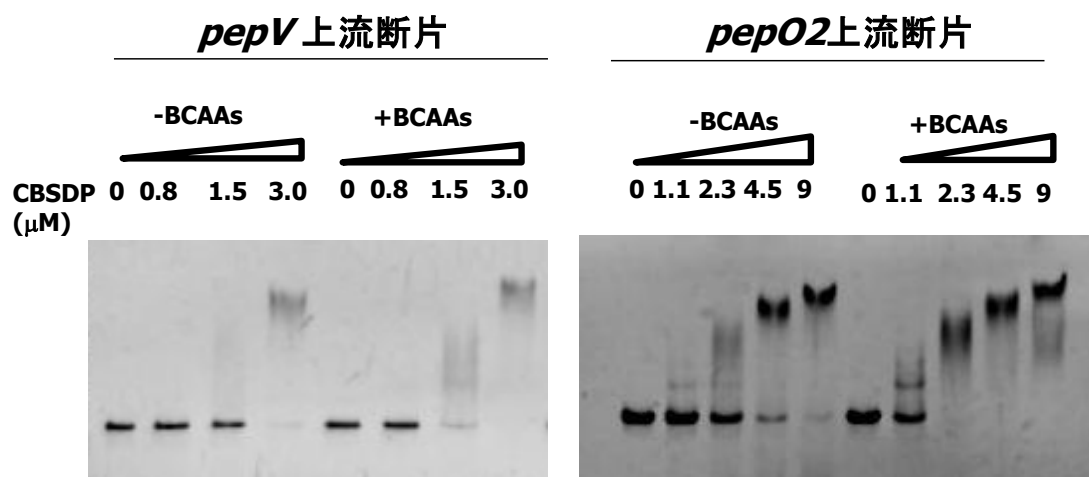


図 4.2 26kDaのCBSドメイン蛋白質(CBSDP)のGlutathione S-Transferase (GST)融合蛋白質の設計と形質転換大腸菌からの精製 (A) 大腸菌内で発現させたGST融合CBSDPをグルタチオンカラムで精製し、ファクターXaによる切断によってCBSDPを溶出・精製し、5-15%SDS-PAGEで解析した。レーン1;菌体破碎液、レーン2;カラム非吸着画分、レーン3;ファクターXa切断画分、レーン4;カラム再通過による狭雑GSTの除去、精製CBSDPの位置を←で示した。(B) 設計したGSTとの融合蛋白質の配列、GST蛋白質はC末端の一部の融合部分のみを四角で囲って示した。また、ファクターXaでの切断点を↓で、CBS pair構造を赤字で示した。配列上の数字はアミノ酸番号



**図 4.3 精製CBSDPを用いたゲルシフトアッセイ** 精製CBSDPと*pepV*および*pepO2*遺伝子上流断片(それぞれ309bpと310bp)を用いたゲルシフトアッセイ。1レーンあたり約15ngのDNAを用い、10mMの分岐鎖アミノ酸(BCAA)の有無で、CBSDP濃度を変化させてTBEバッファー、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。レーン上の数字はCBSDP濃度( $\mu$  M)を示す。

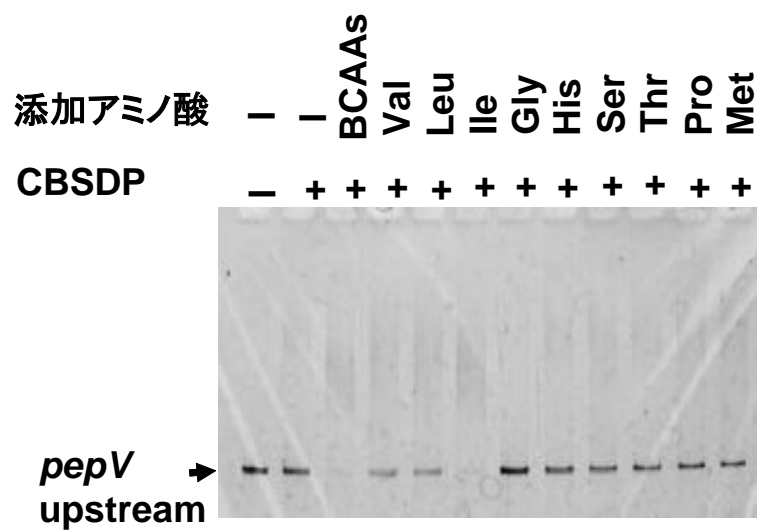


図 4.4 各種アミノ酸がCBSDPのDNA結合に与える影響 1.5 $\mu$  MのCBSDPと*pepV*上流309bpのDNA断片を各種アミノ酸と混合し、DNAへの結合性をTBEバッファー、5%ポリアクリルアミドゲルを用いたゲルシフトアッセイにて評価した。1レーンあたり約10ngのDNAを用いた。BCAAs: 各10mMのVal、Leu、Ileを混合、その他のアミノ酸はそれぞれ単独で10mM添加。

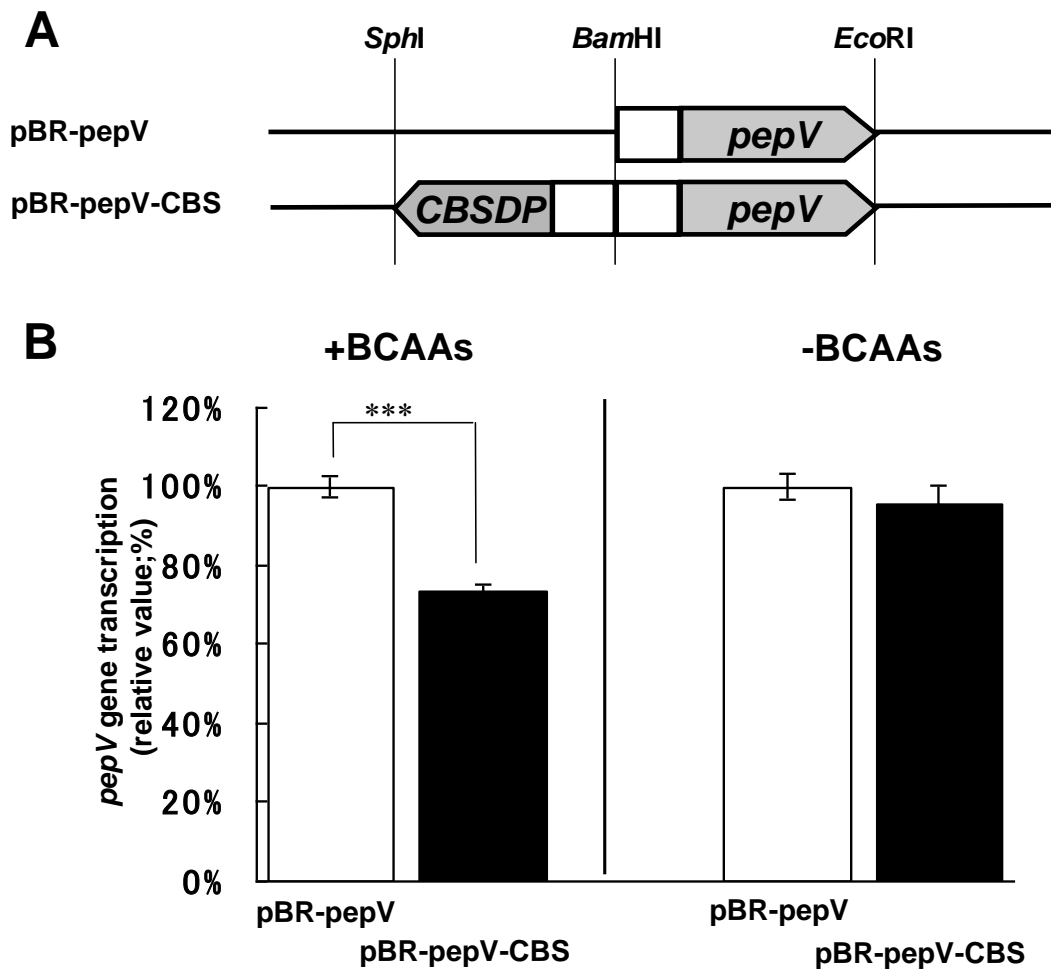


図 4.5 CBSDPが $pepV$ 遺伝子の転写に与える影響の大腸菌を用いた評価 (A) $pepV$ 転写量評価のために大腸菌に導入した2種類の構築プラスミド模式図。 $pepV$ のORFの上流500bpを含むDNA断片をpBR322に挿入したプラスミド (pBR-pepV)。CBSDP遺伝子をpBR-pepVに挿入したプラスミド(pBR-pepV-CBS)。図中の口は約500bpの $pepV$ 遺伝子上流領域を示し、 $pepV$ 、 $CBSDP$ は各遺伝子ORFを示した。(B) 形質転換大腸菌内の $pepV$ 転写量。2種類のプラスミドを形質転換した大腸菌を0.4%カザミノ酸と10mM BCAAsを含む培地(+BCAA)と含まない培地(-BCAA)で培養し、 $pepV$ 遺伝子転写量をRT-PCRで確認した。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ( $GAPDH$ )遺伝子を内部標準として使用、エラーバーは、標準誤差を示す、実験は3回実施し、Student's  $t$ -testで統計処理を実施、\*\*\* $p < 0.001$ 。

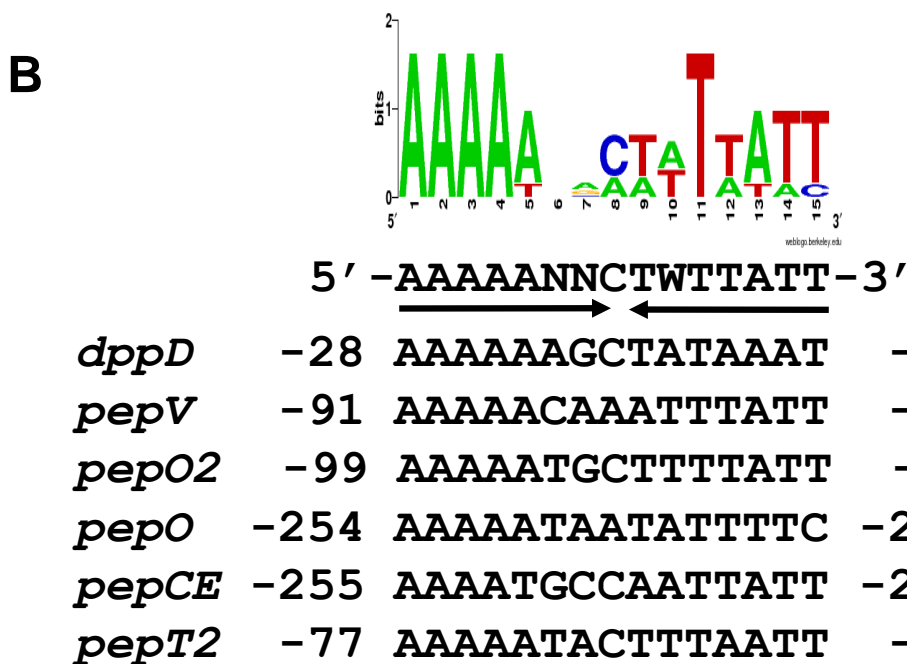
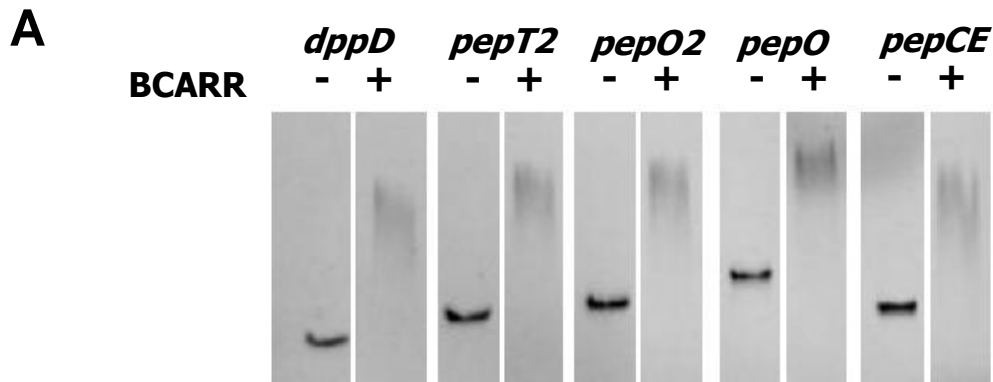


図 4.6 蛋白質分解系遺伝子上流領域DNA断片を用いたゲルシフトアッセイと結合モチーフの推定 (A) 5種類の蛋白質分解系遺伝子上流領域と2.2 $\mu$  MのBCARR(=CBSDP)を用いて10mM BCAAsの存在下でゲルシフトアッセイを行った。1レーンあたり約10ngのDNAを用い、BCARRの有無は+もしくは-で示した。(B) 6種の遺伝子上流領域に共通するDNAモチーフをMEME解析(Bailey & Elkan, 1994)を用いて推定し、Weblogo website (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)を用いて図示した。WはAもしくはT、Nは全ての塩基、 $\rightarrow\leftarrow$ は逆位反復配列、左右の配列番号は各遺伝子のスタートコドンからの塩基数(*pepCE*, *pepO*に関しては、同一オペロンの先頭のORFのスタートコドンからの塩基数)。

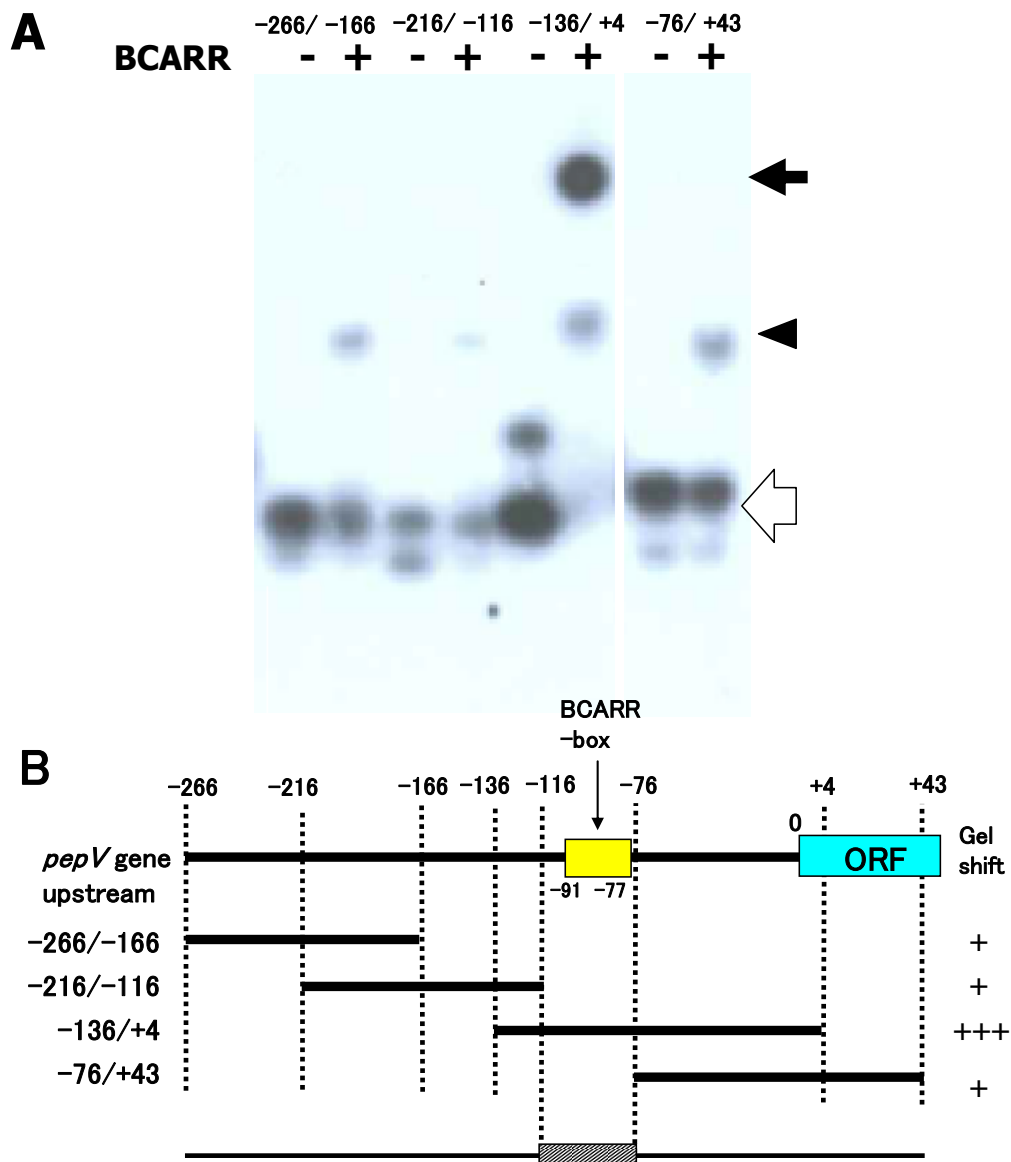
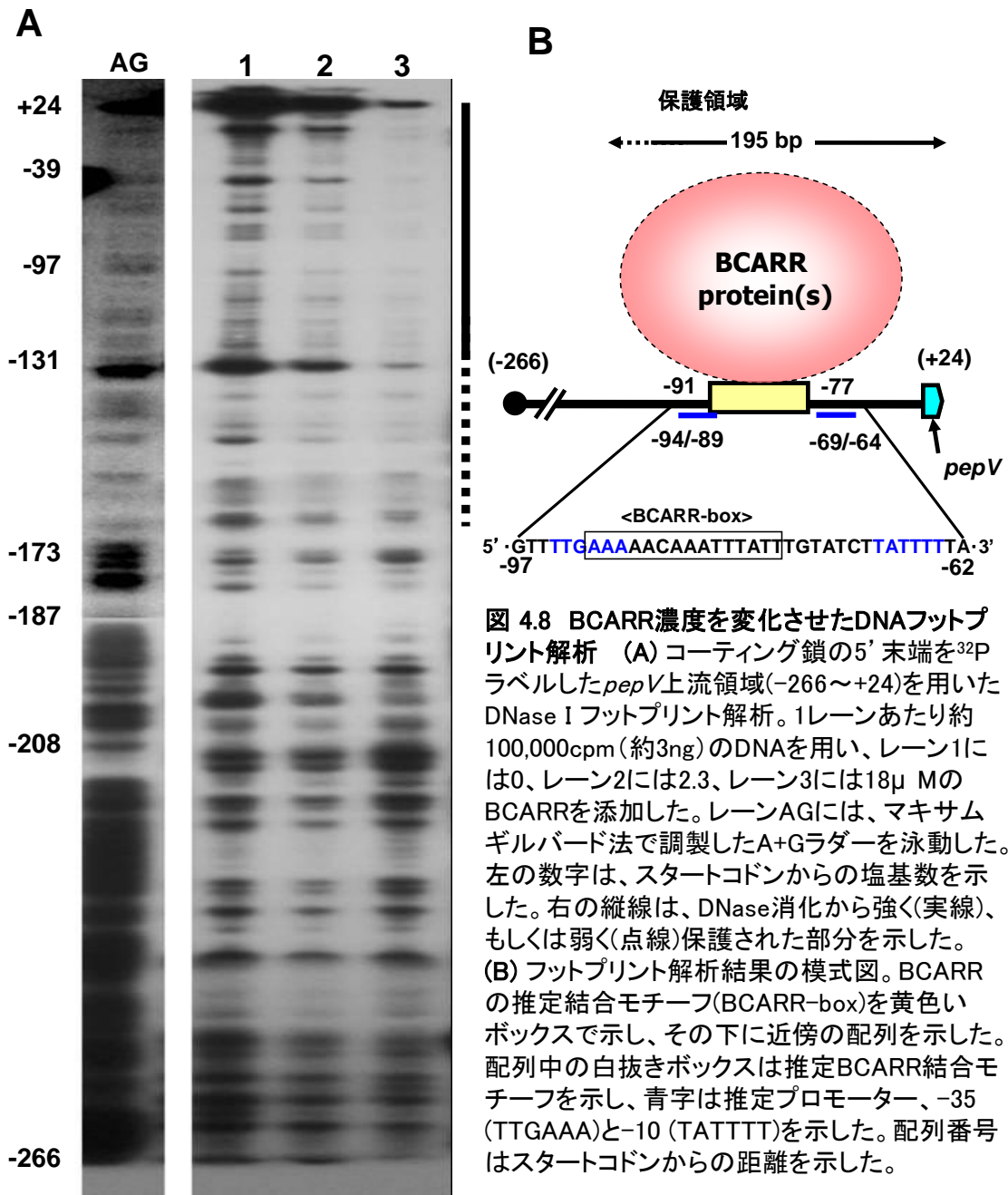
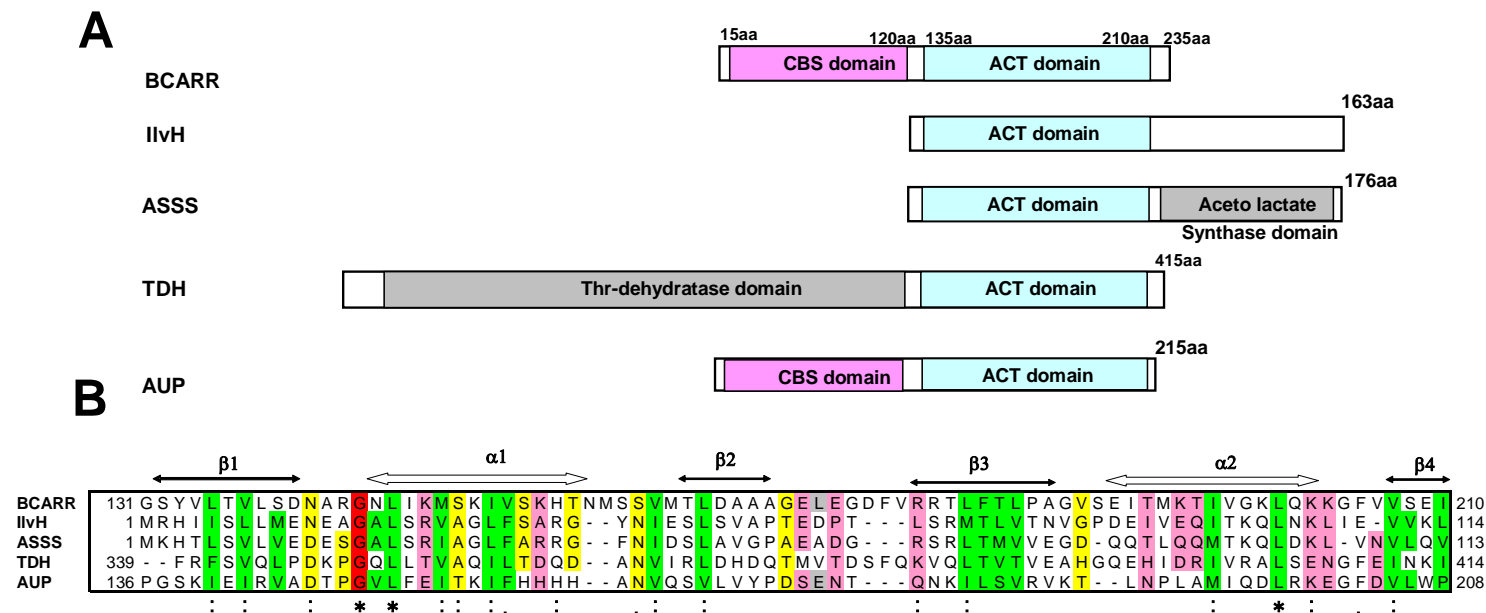


図 4.7 短断片のDNA上流領域を用いたゲルシフトアッセイ (A) 2.3 $\mu$  MのBCARRと短断片した*pepV*上流領域を用いて、10mM BCAAs存在下でゲルシフトアッセイを行った。1レーンあたり約2,500cpm(約0.3ng)の<sup>32</sup>PラベルDNAを用いた。白抜き矢印で元のプローブを、矢頭でシグナルが弱く移動度が小さいバンドを示し、矢印でシグナルが強く移動度が大きいバンドを示した。(B) ゲルシフトアッセイに用いたDNAプローブを模式的に図示した。配列番号はスタートコドンからの塩基数でBCARR-boxは推定された保存DNAモチーフを示した。







**図 4.9 BCARRのC末端のドメイン構造解析** (A) BCARRのC末端に確認されたACTドメインを有する蛋白質配列とのアライメント(ClustalWによる)。(B) 推定2次構造: $\alpha$ ,  $\alpha$  ヘリックス;  $\beta$ ;  $\beta$  シート、各アミノ酸の色づけは、Grant *et al.* 2006)と Aravind and Koonin (1999)の方法に従った。緑, hydrophobic (ILVCGAGMFYWTP); ピンク, polar (HKREQDNST); 灰色, large (FILMWYKREQ); 黄色, small (ACGSTDNVP); 赤, 保存されたグリシン残基。IlvH; Acetohydroxylate synthase small regulatory subunit [*Nitrosomonas europaea*] (ref|NC\_004757.1|), ASSS; Acetolactate synthase small subunit [*Synechococcus* sp. WH 7803] (emb|CAK24070.1|), TDH; threonine dehydratase [*Selenomonas noxia* F0398] (gb|EHG23294.1|), AUP; acetoin utilization protein [*Lysinibacillus sphaericus* C3-41] (ref|YP\_001699789.1|)。“\*”、“:”、“.”は ClustalWの方法に従い、“\*”は単一の完全に保存された残基を、“:”は‘strong’ group内で保存された残基を、“.”は‘weaker’ group内で保存された残基を示す。配列の横の数字はアミノ酸番号を示す。

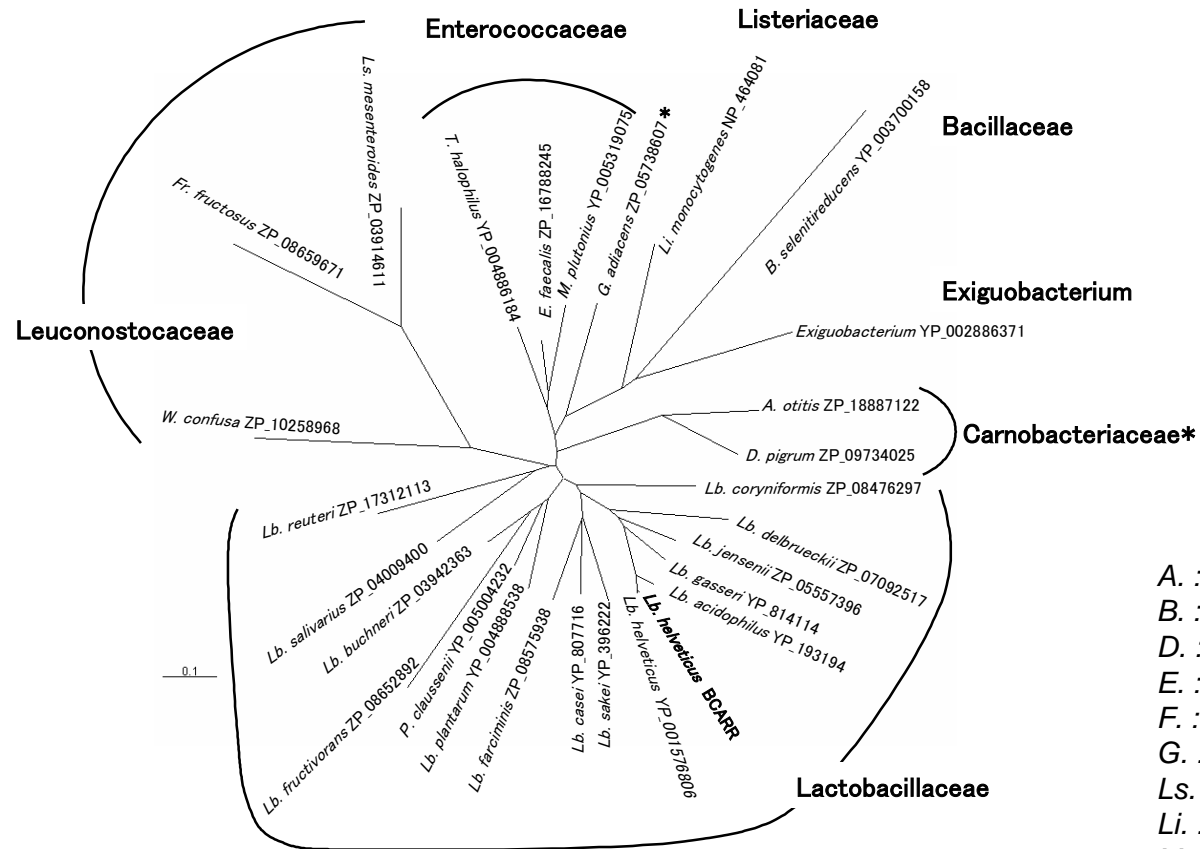
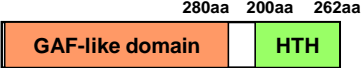
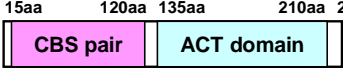


図 4.10 BCARRとの相同蛋白質の系統樹 BCARRの相同蛋白質をBLASTPで検索し(e-value $<10^{-50}$ )、系統樹を、ClustalWで作成し、Unrooted phylogenetic tree with branch length (N-J)法を用いて記した。系統樹を単純化するため、各属から1種類の結果を選択して記載した。*Lactobacillus*属からは、各subgroupから1種を選択し、*L. helveticus*種を含む*delbrueckii* subgroupからは4種を選択して記載した。*Lactobacillus*属のsubgroupの分類は過去の報告(Felis & Dellaglio, 2007)に従った。

	CodY	BCARR
ドメイン構造		
分子量(MW)	29	26
4次構造	二量体	(多量体と推察)
<i>cis</i> エレメント	AATTTTCWGAAAATT (15bp)	AAAAATACTWTTATT (15bp)
コファクター	BCAAs、GTP*	BCAAs
コファクターの強さ	Ile>Leu=Val	Ile>Leu=Val
DNA結合ドメイン	HTH	(CBS pairと推察)

#### 図 4.11 BCARRとCodYの比較

\*, GTPは*B. subtilis*のCodYにとって捕因子であるが、*L. lactis*のCodYには影響しない。

GAF, 3つ蛋白質の頭文字(cGMP-stimulated phosphodiesterases, adenylate cyclases, FhlA(細菌の転写因子)); HTH, ヘリックスターンヘリックスドメイン;

CBS pair, Cystathionine  $\beta$ -synthase domain pair;

ACT, 3つの酵素の頭文字(Aspartate kinase、Chorismate murase、TyrA (prephenate dehydrogenase))

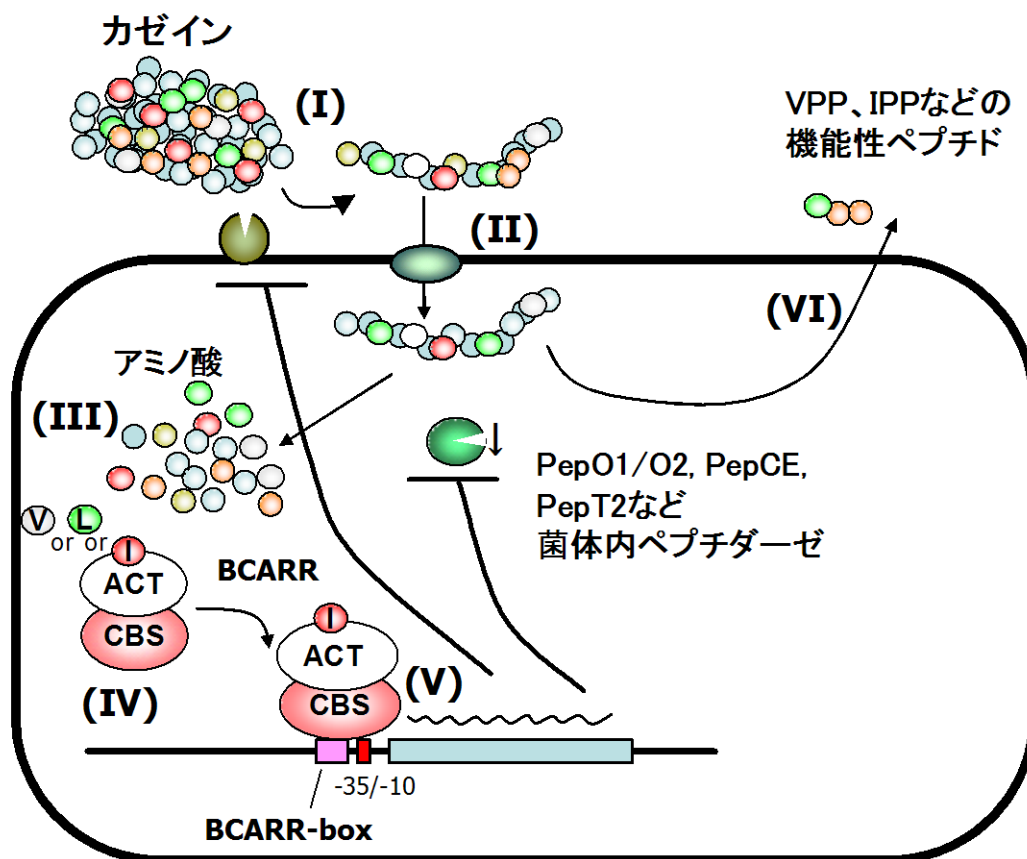


図 4.12 *L. helveticus*における蛋白質分解系の発現制御システムの推定 (I)菌体外プロテナーゼによって乳蛋白質からオリゴペプチドが切り出される。(II)トランスポーターによってオリゴペプチドが菌体内に取り込まれる。(III)菌体内の各種ペプチダーゼによってオリゴペプチドがアミノ酸まで分解される。分解されづらいVPP、IPPといったペプチドやアミノ酸が蓄積する。(IV)BCARRが菌体内に蓄積した分岐鎖アミノ酸と結合する。(V)分岐鎖アミノ酸と結合したBCARRが蛋白質分解系遺伝子上流領域の結合モチーフに結合し転写を抑制し、活性を制御する。(VI)蛋白質分解活性の抑制の結果として、VPP、IPPなどの機能性ペプチドの加工が抑制される。

L; ロイシン、I; イソロイシン、V; バリン、BCARR; BCAA responsive transcriptional regulator、ACT; ACTドメイン、CBS; CBS pair。

## 第5章 総合討論

### 5.1. 結果まとめ

*L. helveticus* 種の高い蛋白質分解活性は、チーズの熟成やさらに、機能性ペプチドの高生産性から注目されているものの網羅的な理解はなされていなかった。本研究では、乳酸菌群の中で最も蛋白質分解能が高く、ペプチド生産性の高い *L. helveticus* 種のうち、特に菌体外プロテイナーゼ活性が高く、機能性ペプチドの生産性が高い、*L. helveticus* CM4 株の蛋白質分解系の解明を目的とした。さらに、その蛋白質分解活性がアミノ酸の獲得により負のフィードバック制御をうけることに着目し、その制御機構の解析を行った。詳しくは、全ゲノム配列解読による蛋白質分解系遺伝子群の網羅的な解析と、培地中のペプチドやアミノ酸濃度に応じた蛋白質分解系遺伝子転写制御機構の解明、さらにはその解析により機能性ペプチド産生における関与遺伝子群の考察とそれによる機能性ペプチド生産性改良への技術情報を得ることを目的とした。その結果、*L. helveticus* CM4 株は、培地中のペプチド量の増加によって蛋白質分解系遺伝子群の転写量が抑制されることを明らかにし、その転写制御には、菌体内 BCAAs を認識して DNA への結合が促進する転写調節因子 BCARR が関与する可能性を示した。これらの知見は、*Lactobacillus* 属の乳酸菌で今まで知られていなかった蛋白質分解系の制御システムであり、蛋白質分解系の遺伝子発現調節において極めて重要と考えられた。

本検討で得られた知見により、今後、転写制御因子の改変によりさらなる蛋白質分解活性が高い株の育種・スクリーニングや蛋白質分解を促進する発酵制御法開発につながる可能性がある。従ってこれらの *L. helveticus* 種の蛋白質分解系遺伝子群の発現制御における基礎的知見は、血圧降下ペプチドを含む様々な機能性ペプチドの生産強化や産業利用において極めて重要な情報となると考えられる。以下に各章ごとの結果をまとめて示す。

具体的には、2章で *L. helveticus* CM4 株のゲノム解析結果をもとに全蛋白質分解系遺伝子群を推定し、血圧降下ペプチドの切り出しに関与すると推定される菌体内ペプチダーゼとして、アミノペプチダーゼ群(N末端の切り出し)、エンドペプチダーゼ群(C末端の切り出し)、X-プロリルジペプチジルペプチダーゼ(X-Pro配列の切り出し)の各遺伝子群の存在と配列を明らかとした。また、*L. helveticus* DPC4571 株との

蛋白質分解系酵素群の遺伝子比較、および菌体外プロテイナーゼ活性、血圧降下ペプチド産生量の比較解析から、血圧降下ペプチドの生産性には菌体外プロテイナーゼが強く影響を与えることを明らかにした。従ってまた、血圧降下ペプチド VPP と IPP の生産性強化には菌体外プロテイナーゼの酵素活性を高めることが効果的と考察された。

第 3 章においては、*L. helveticus* CM4 株発酵乳中へのアミノ酸やペプチドの添加が、蛋白質分解系遺伝子群の転写量、菌体外プロテイナーゼ活性、および血圧降下ペプチド産生量を低下することを見出し、ペプチド添加による菌体内アミノ酸濃度に応じた蛋白質分解系遺伝子の発現制御システムの存在を明らかにした。すなわち、DNA マイクロアレイを用いて、ペプチド添加による全遺伝子の転写量変化を網羅的に解析することにより、多くの蛋白質分解系遺伝子の転写が抑制されることを明らかにした。

第 4 章では、菌体内アミノ酸濃度に依存した転写調節機構の解明を目指し、ペプチド添加によって転写が抑制された蛋白質分解系遺伝子上流領域にアミノ酸濃度依存的に結合する 26kDa の CBS ドメインを有する蛋白質(CBSDP)を単離・同定することに成功した。大腸菌に *L. helveticus* CM4 株由来の 26kDa 蛋白質遺伝子とレポーター遺伝子として転写制御が期待出来る *pepV* 遺伝子を導入して BCAAs 添加による *pepV* 遺伝子の転写に与える影響を評価した結果、BCAAs を含む培地で 26kDa 蛋白質の発現が *pepV* 遺伝子の転写を抑制する可能性を示した。以上の事から、単離した 26kDa 蛋白質は新規な BCAAs 応答性転写制御因子であり、BCAA Responsive Transcriptional Regulator (BCARR)としてデータベースに登録した。

以上の検討を通して同定した BCARR は、乳酸球菌に報告されている CodY とは相同性を示さず、*L. helveticus* 種のみならず *Lactobacillus* 属乳酸菌や *Leuconostocaceae* 科や *Enterococcaceae* 科に広く存在する過去に報告のないアミノ酸応答性の転写調節因子である可能性が示された。これまでアミノ酸依存的な転写調節機構が明らかとなっていなかった他の科や属の細菌においても BCARR の相同性遺伝子の存在が確認されたことから、それらの細菌においても BCARR が遺伝子転写制御を担っている可能性が示された。

## 5.2. 考察

<アミノ酸応答性転写調節因子について>

4章に記載のとおり、*L. helveticus*種の菌体外プロテイナーゼの活性が培地中のペプチド・アミノ酸量やLPなどのある種の短鎖ペプチド量の増加によって、著しく低下することがこれまでに報告されていた(Hebert *et al.*, 2000; Sadat-Mekmene *et al.*, 2011)。これらペプチドやアミノ酸による菌体外プロテイナーゼ活性の抑制は、*L. helveticus*種だけでなく *Lactobacillus*属の乳酸菌である *L. rhamnosus*種、*L. delbrueckii*種などでも報告されている(Hebert *et al.*, 2008; Paštar *et al.*, 2003)。また、*L. helveticus*種を含む *Lactobacillus*属において、培地中のアミノ酸・ペプチド量の増加が蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制することが示唆されていた(Azcarate-Peril *et al.*, 2009; Paštar *et al.*, 2007; Smeianov *et al.*, 2007)。しかし、*Lactobacillus*属において、これらの蛋白質分解系遺伝子のアミノ酸・ペプチドに応答した転写調節機構は明らかとなっていなかった。本研究では、*Lactobacillus*属で初めて、BCAAsに応答した蛋白質分解系遺伝子群の転写調節因子の存在を明らかとした。BCAAsであるロイシンを含むジペプチドLPによって菌体外プロテイナーゼ活性が著しく低下するという報告からも、BCAAsを認識する転写調節因子が蛋白質分解系遺伝子の転写調節を担っている可能性を支持する。4章に記載のように、*Bacillus*属や *Lactococcus*属にはCodYと呼ばれるBCAAs応答性の転写調節因子が存在することが示されているが(den Hengst *et al.*, 2005)、*Lactobacillus*属に *codY*の相同遺伝子は存在していなかった。また、大腸菌ではロイシン応答性の転写調節因子(Leucine-Responsive Regulatory Protein; Lrp)が存在するが(Calvo & Matthews, 1994)、*Lactobacillus*属や *Lactococcus*属の乳酸菌には相同遺伝子が存在していなかった。本研究で明らかとしたBCAAs応答性の転写調節因子BCARRは、これまでに報告のあるアミノ酸応答性転写調節因子とは配列類似性を示さない新規の転写調節因子であった。相同性解析からは機能が推察できなかったBCAAs応答性の転写調節因子の発見は学術的に大変意義のある知見になると考えられる。今後は、BCARR欠損株の機能解析やBCARRと相互作用する因子の探索などによって、より詳細に転写調節機構を明らかとすることができると考えられる。

#### <アミノ酸による転写抑制効果について>

本研究のきっかけとして、いくつかのアミノ酸を単独で *L. helveticus* CM4株発酵乳に添加して培養した際に、発酵乳中での血圧降下ペプチド産生量の違いが見られ



るという現象があった(図 3.3)。そこで、ペプチド産生を抑制したアミノ酸は、BCAAs である Ile、Leu、Val と Gly、Phe、Met、Ser であった。一方、4 章において、3 種類の BCAAs のみがゲルシフトアッセイで BCARR の DNA プローブへの結合を促進した。加えて、3 種類の BCAAs の中で Ile が最も DNA 結合促進効果も血圧降下ペプチド産生抑制効果も強かった。この結果は、BCAAs の認識に BCARR が関与し、転写調節を介して蛋白質分解系の活性を制御し、その結果、血圧降下ペプチドの産生を抑制した可能性を支持する。しかし、3 種類の BCAAs 以外のアミノ酸は BCARR の DNA 結合を促進しなかったことから、Gly、Phe、Met や Ser など BCAAs 以外のアミノ酸が関与するペプチド生産抑制システムの存在が考えられる。これらの現象をより詳細に理解するためには、菌体内アミノ酸濃度の評価や Gly、Phe、Met や Ser など BCAAs 以外のアミノ酸が培地中や菌体内に蓄積した際に蛋白質分解系の活性や転写、さらには菌体の代謝機能がどういった影響を受けているか確認する必要がある。アミノ酸による BCARR の DNA 結合促進効果は、3 種類の BCAAs 添加時のみ効果があり、中でも Ile の効果が最も大きい。興味深いことに CodY においても同様に 3 種類の BCAAs が効果的であり、中でも Ile で最も効果が大きいことが報告されている (Guédon *et al.*, 2001)。Ile や BCAAs が BCARR の DNA 結合において最も高い効果を示す理由は不明であるが、*L. helveticus* CM4 株にとって Ile は生育に必要なアミノ酸であり、栄養素としての要求性を示す BCAAs をセンシングすることで、BCAAs 飢餓時のスイッチオンと過剰時のスイッチオフがより効率的に制御出来ることが推測される。

一方、アミノ酸に比べてペプチド添加の場合に、菌体外プロテイナーゼ活性と血圧降下ペプチドの生産抑制が顕著であることが確認されている。アミノ酸よりもペプチドの方が蛋白質分解活性や転写に対する抑制効果が高いという結果は、BCAAs を認識する CodY によって蛋白質分解系遺伝子の転写が調節される *L. lactis* 種においても報告されている (Marugg *et al.*, 1995)。*L. lactis* 種の研究から、ペプチドはアミノ酸に比べて菌体内への取り込み効率がが高く、菌体内で速やかに加工・蓄積されたアミノ酸が最終的により効果的に転写制御に働くものと考えられている。*L. helveticus* CM4 株においても、アミノ酸よりもペプチドの菌体内への取り込み効率がが高く、ペプチド添加時の方が菌体内アミノ酸濃度の上昇が著しかったことが、転写抑制における効果の違いとして考察できる。今後、これらの考察を実証する上で、菌体内のアミノ酸濃度の評価と各濃度における転写制御への影響を評価する必要がある。

#### <転写調節機能の評価に関して>

本研究では、アミノ酸による転写抑制効果を評価するために *pepV* 遺伝子を用いて試験を行った。BCARR および *pepV* 遺伝子を共発現した大腸菌での BCAAs 添加時の *pepV* 転写量は 73% で、その抑制程度は弱いものの統計的に有意な効果であり、その抑制効果は *L. helveticus* CM4 株でのペプチド添加に応答した際の *pepV* 転写量 73% と同等であった。今後はより遺伝子発現抑制の大きかった蛋白質分解系遺伝子を用いて、BCAAs 添加時の転写抑制効果を評価する予定である。また、転写抑制効果と各種遺伝子上流への結合性の関連性に関して比較評価することが重要であり、さらにはより結合性の高い遺伝子配列、転写抑制により効果的な遺伝子配列を考察する必要がある。そのためには、本研究で実施したゲルシフトアッセイに替わる、分子間の親和性の評価により適した Biacore 法の導入などによる評価が望ましい。それにより MEME 解析によって蛋白質分解系遺伝子上流領域から検索した共通モチーフがより精度の高いものになると思われる。

また、この結果から大腸菌内で発現した BCARR が DNA に結合することによって、*L. helveticus* 種のプロモーター領域への大腸菌 RNA ポリメラーゼの結合を阻害することが推定され、*L. helveticus* 種においても BCARR の DNA 結合によって RNA ポリメラーゼのプロモーター領域への結合阻害がされることが推測される。一方、*L. helveticus* 種の菌体内においてはこれら 2 種の蛋白質のプロモーター領域への結合性に影響を与える他因子の存在も否定できない。例えば、今回 DNA カラムから溶出されたプロリル-tRNA シンターゼとアノテーションされた 67kDa の蛋白質 (図 4.1) の転写への影響評価にも興味もたれる。今後は BCARR と相互作用する蛋白質の探索や、*L. helveticus* 種を用いた形質転換方法の開発や、形質転換系が確立されている BCARR を保有する他の乳酸菌種を用いて BCARR 遺伝子の欠損株を作出し、アミノ酸の影響を評価するなど、BCARR の転写調節因子としての役割をより明確にする必要がある。

#### <菌体外プロティナーゼ>

*L. helveticus* CM4 株からは、2 種類の菌体外プロティナーゼ遺伝子が本研究により確認された。菌体外プロティナーゼは、培地中の蛋白質を最初に分解することから、菌体がアミノ酸を獲得する意味においても機能性ペプチドの生産性においても非

常に重要な酵素である。2章では菌株間で、また3章ではペプチド添加・非添加時における、菌体外プロテイナーゼ活性と血圧降下ペプチド生産性の比較を実施し、血圧降下ペプチド産生における菌体外プロテイナーゼの重要性があらためて示された。そのため菌体外プロテイナーゼの分子種ごとの活性や活性化機構は興味深い、本検討では明らかとなっていない。それらの解明には、時間と技術を要するが *L. helveticus* 菌体から分子種ごとに菌体外プロテイナーゼの単離・精製を行い、性質を確認する必要がある。また、菌体外プロテイナーゼ遺伝子の異種発現や欠損株の作出により、遺伝子産物の機能を確認することが可能と考えられる。しかし、菌体外プロテイナーゼは翻訳後にシグナルペプチドによる菌体外輸送、活性化因子による活性化が行われると考えられるため、異種発現には多くの課題が残る。一方、*L. helveticus* 種の遺伝子欠損株の作出が期待されるが、*L. helveticus* 種は形質転換効率が極めて低く、筆者らの研究室では形質転換法が確立されていない。今後 *L. helveticus* 種の形質転換法の確立、および欠損株の作出によって、これらの課題が解決されることを期待したい。

#### <血圧降下ペプチドの生産に関して>

以上の研究を通して明らかにした *L. helveticus* CM4 株における蛋白質分解系の全体像と、乳内の主要蛋白質であるカゼインから蛋白質分解系の働きで加工生産される血圧降下ペプチド、VPP、IPP 加工機構について考察して図 4.12 にまとめて示した。(I)最初に細胞壁結合プロテイナーゼによって乳中の主要な蛋白質であるカゼインが切断されオリゴペプチドが遊離する。(II)切断されたオリゴペプチドの中には VPP と IPP 配列を含むペプチドが含まれ、オリゴペプチドトランスポーターを介して菌体内に取り込まれ、(III)菌体内の多くのペプチダーゼによってアミノ酸まで分解され利用される。特に VPP、IPP の前駆ペプチドは、エンドペプチダーゼ(PepO1、PepO2、PepT2 など)、アミノペプチダーゼ(PepCE など)、XPDAP(PepX)などによって分解され、VPP、IPP が切り出されるものと推定された。一方、(IV) 菌体内に蓄積したアミノ酸、特に BCAAs 濃度が上昇すると BCARR と結合する。(V)BCAAs と結合した BCARR は、蛋白質分解系遺伝子上流域に存在する BCARR 結合配列(BCARR-box)に結合し蛋白質分解系遺伝子の転写を抑制する。(VI) その結果、蛋白質分解活性が負のフィードバックを受け抑制され、蛋白質分解系の過度の発現を抑えるものと推測できる。その結果として VPP、IPP の産生も抑制される。このように、*L. helveticus* CM4 株において、菌体内アミノ酸濃度に応じた効率的な蛋白質分解系遺伝子群の発現が転

写レベルで制御されていることが示され、その転写調節に関与する因子が本研究において初めて明らかにされた。

#### <蛋白質分解活性が高い乳酸菌の育種・探索への応用>

本研究で得られた BCARR による蛋白質分解系遺伝子の転写制御という知見は、発酵乳中のペプチド生産性の強化、さらには血圧降下ペプチドをはじめとしたさまざまな機能性ペプチドの生産性の強化に応用可能である。蛋白質分解活性が高くペプチド生産強化につながる菌株の育種には、特に乳の主要蛋白質であるカゼインの初期の分解に関わる菌体外プロテイナーゼの活性強化が考えられ、当研究室でも古典的な方法により繰り返し実施してきた。すなわち変異剤による変異誘発後、菌体外プロテイナーゼ活性の増加株に期待される乳平板培地での大型コロニー形成株の選抜である。しかし、元々の親株となる菌株の菌体外プロテイナーゼ活性が高いこと、さらに既に記載の内容から推測されるように乳平板培地上においても乳酸菌コロニーの成長に伴いペプチドが生産される結果、平板上のペプチドによる分解系遺伝子の制御が起こることから、平板上でのコロニーサイズからの分解活性の強い株の厳密なスクリーニングが難しいことが示された。今回の研究で得られた知見から、BCARR の欠損株を作出し、菌体内アミノ酸濃度による蛋白質分解系遺伝子の転写制御が解除された菌株を作出することによって、菌体外プロテイナーゼを含めた蛋白質分解系の活性が制御されず、強化された菌株を作出できる可能性が示された。また一方で、BCARR が結合する DNA 領域(シスエレメント)を改変することで、ある特定の遺伝子のみがアミノ酸による抑制を受けない菌株を作出することができる。例えば、菌体外プロテイナーゼ遺伝子群のみ制御を受けない場合にはオリゴペプチドを多く蓄積する菌株を、ある種の菌体内ペプチダーゼ群のみ制御を受けない場合には特定の短鎖ペプチドを多く蓄積する菌株を、アミノ酸トランスポーターのみ制御を受けない場合には培地中にアミノ酸を多く蓄積する菌株を作出できる可能性がある。こういった菌株の効率的な取得には、*L. helveticus* 種の形質転換によるゲノム改変方法の開発や各種酵素等の基質特異性などの解析が必要となる。

上記のとおり、遺伝子組換えによる蛋白質分解活性の高い株の作出が可能と考えられるが、産業上の利用はパブリックアクセプタンスが得られないことから難しいと考えられる。既述のとおり、変異誘導と選択培地によるスクリーニングを実施し、自然変異株の作出が望まれるが、本検討での知見を活用することによって、スクリーニ

ングを効率的に実施できる可能性がある。例えば、アミノ酸アナログの利用である。アミノ酸アナログとはアミノ酸の類似体で、菌体内でアミノ酸と認識されるが翻訳時に利用できない物質である。アミノ酸生産菌の育種などでは、最終産物として生産したいアミノ酸によって負のフィードバックが引き起こされ、アミノ酸の生産が抑制されることが知られており、アミノ酸アナログ耐性株の選抜によって負のフィードバックが解除されたアミノ酸高生産性の菌株の育種に成功している。本検討から得られた知見から、*L. helveticus* 種においても、BCAAs のアナログ耐性株を選抜することによって、BCARR に変異が導入され、BCAAs に応答した蛋白質分解系遺伝子群の転写調節が解除された株を作出できる可能性がある。さらに、本検討でアミノ酸よりもペプチドで転写制御効果が大きかったことから、BCAAs のアナログを含むペプチドを用いて耐性株を選抜することによって、さらに効率のよい選抜になると考えられる。

アミノ酸アナログの利用に加え、BCARR 支配下にある遺伝子産物の中で変異誘発後のスクリーニングが比較的容易なペプチダーゼ群やトランスポーター群の活性抑制が解除された菌株の選択も有用と考えられる。例えば、乳平板培地にペプチダーゼの発色基質を添加し、アミノ酸添加によっても発色強度が変化しない株の選択が考えられる。また、BCARR による制御を受ける遺伝子群が多い事を考えれば、2重、3重のスクリーニング方法を組み合わせることも極めて有用な方法となると考えられる。

### 5.3. 今後の展望

本検討の目的は、乳酸菌の中で最も蛋白質分解活性が高い *L. helveticus* 種の蛋白質分解系の解明とそれらの制御機構を明らかにし、蛋白質分解活性が高い乳酸菌の育種、探索、培養方法の改良や機能性ペプチド高生産における手掛かりを得て、その後のペプチド生産性向上に役立てることにあった。本検討の結果、*L. helveticus* 種において BCAAs に応答して BCARR が転写調節因子として蛋白質分解系遺伝子群の転写調節に関与することを初めて明らかにすることができた。本検討で明らかとなった BCARR は、*Lactobacillus* 属だけでなく他の科の細菌においてもホモログが確認され、BCAAs 依存的な転写調節を担っている可能性が示された。新規の BCAAs 応答性の転写調節因子の発見は1菌種における発見にとどまらず、アミノ酸に応答した制御系が広く微生物において存在する可能性を強く示唆しており、乳酸菌の蛋白質分解系のみならず、微生物の特に代謝関連の研究分野においてそれぞれの菌種における役割の

理解や進化的な意義の解析など今後の研究の広がりからも大変興味ある知見である。

また、本研究の成果は、機能性ペプチド生産の効率化という面で、産業面での応用も大変期待できる。*L. helveticus* 種は乳酸菌の中で最も蛋白質分解活性が高く、ヨーグルト、チーズなど発酵乳の製造や機能性ペプチドの産生に極めて有用な菌種である。特にその発酵乳の血圧降下作用に関しては、多くの臨床試験において実証され、機能性食品成分として産業利用されている。本検討で見出された **BCARR** による蛋白質分解酵素遺伝子群の転写制御に関する新たな技術情報は、今後、蛋白質分解活性の抑制解除による蛋白質分解酵素活性の強化が期待できる高ペプチド生産菌株の育種や効率的な発酵法開発につながる技術開発に役立つ可能性がある。既に述べたように、転写調節因子である **BCARR** の欠損株の作出によって、アミノ酸によって蛋白質分解系全体が転写制御を受けない株を得ることで、発酵を通してより蛋白質分解活性が高い菌株の育種に応用できる。さらに、遺伝子上流の **BCARR** 結合領域の改変によって特定の蛋白質分解系遺伝子のみ転写制御を受けない株を作出し、特定のペプチドを多く産生する菌株の探索に応用できる。また、*L. helveticus* 発酵乳には血圧降下以外にも様々な機能性ペプチドが生産されることが報告されており、上記の蛋白質分解系酵素群の遺伝子発現抑制の解除はこれら機能性成分の強化にもつながる可能性がある。加えて、蛋白質分解活性が高い *L. helveticus* 種は、チーズ製造時に旨みを有するアミノ酸を多く産生することから、呈味向上にも応用が可能である。さらに、分解が進んだ発酵乳は吸収性がよく栄養価を高めると考えられる。これらのことは、乳酸菌発酵乳摂取による健康の維持やそれに関連した製品開発による産業上の貢献が期待できる。特に、長い食経験とゲノム解析により安全性が確認されている乳酸菌発酵乳の食品としての利用は消費者からもその安全性、健康機能性、さらには食品としての嗜好性への理解が得られやすく、産業上の貢献に大きな期待ができる。今後、本研究での成果がきっかけとなり様々な乳酸菌発酵乳の研究および開発が活性化することを期待したい。

## 略語

BSA	Bovine serum albumin
BCAAs	Branched chain amino acids
BCARR	Branched chain amino acids responsive transcriptional regulator
CBSDP	CBS domain protein
COG	Cluster of orthologous group
CBS	Cysthacionine $\beta$ -synthase
GST	Glutathione S-transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylene glycol
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Revers transcription PCR
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
TBE	Tris borate EDTA
XPDAP	X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase

## 参考論文

Azcarate-Peril, M., Tallon, R. & Klaenhammer, T. (2009). Temporal gene expression and probiotic attributes of *Lactobacillus acidophilus* during growth in milk. *J Dairy Sci* **92**, 870-886.

Aguado-Llera, D., Oyenarte, I., Martínez-Cruz, L. A. & Neira, J. L. (2010). The CBS domain protein MJ0729 of *Methanocaldococcus jannaschii* binds DNA. *FEBS Lett* **584**, 4485-4489.

Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R. & Nakamura, Y. (2005). Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of the American College of Nutrition* **24**, 257-265.

Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999). Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J Mol Biol* **287**, 1023-1040.

ASHAR, M. N. & CHAND, R. (2004). Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft* **59**, 363-366.

Bailey, T. L. & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers: Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego.

Baykov, A. A., Tuominen, H. K. & Lahti, R. (2011). The CBS domain: a protein module with an emerging prominent role in regulation. *ACS chemical biology* **6**, 1156-1163.

Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L. (2008). Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**, 1224-1236.

Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Shimamura, S. & Tomita, M. (1994). Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett Appl Microbiol* **18**, 230-233.

Blagova, E. V., Levnikov, V. M., Tachikawa, K., Sonenshein, A. L. & Wilkinson, A. J. (2002). Crystallization of the GTP-dependent transcriptional regulator CodY from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **59**, 155-157.

Boelsma, E. & Kloek, J. (2009). Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *British Journal of Nutrition* **101**, 776-786.

Bogdanov, I., Dalev, P., Gurevich, A., Kolosov, M., Mal'Kova, V., Plemyanikova, L. & Sorokina, I. (1975). Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS*



*Lett* **57**, 259-261.

**Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Åstrand, M. & Speed, T. P. (2003).** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193.

**Broadbent, J., Cai, H., Larsen, R. & other authors (2011).** Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J Dairy Sci* **94**, 4313-4328.

**Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J. & other authors (2008).** Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J Bacteriol* **190**, 727-735.

**Chen, Y.-S. & Steele, J. L. (1998).** Genetic characterization and physiological role of endopeptidase O from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3411-3415.

**Chen, Y.-S., Christensen, J. E., Broadbent, J. R. & Steele, J. L. (2003).** Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1276-1282.

**Chiba, H., Tani, F. & Yoshikawa, M. (1989).** Opioid antagonist peptides derived from b-casein. *J Dairy Res* **56**, 363-366.

**Chipman, D. M. & Shaanan, B. (2001).** The ACT domain family. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 694-700.

**Cicero, A., Gerocarni, B., Laghi, L. & Borghi, C. (2010a).** Blood pressure lowering effect of lactotripeptides assumed as functional foods: a meta-analysis of current available clinical trials. *Journal of human hypertension* **25**, 425-436.

**Cicero, A. F., Rosticci, M., Veronesi, M., Bacchelli, S., Strocchi, E., Melegari, C., Grandi, E. & Borghi, C. (2010b).** Hemodynamic effects of lactotripeptides from casein hydrolysate in Mediterranean normotensive subjects and patients with high-normal blood pressure: a randomized, double-blind, crossover clinical trial. *J Med Food* **13**, 1363-1368.

**Calvo, J. M. & Matthews, R. G. (1994).** The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **58**, 466-490.

**Clements, M., Levine, M., Ristaino, P., Daya, V. & Hughes, T. (1983).** Exogenous lactobacilli fed to man—their fate and ability to prevent diarrheal disease. *Progress in food & nutrition science* **7**, 29.

**de Leeuw, P. W., Van der Zander, K., Kroon, A. A., Rennenberg, R. M. & Koning, M. M. (2009).**

Dose-dependent lowering of blood pressure by dairy peptides in mildly hypertensive subjects. *Blood pressure* **18**, 44-50.

**De Man, J., Rogosa, M. & Sharpe, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Microbiol* **23**, 130-135.

**den Hengst, C. D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O. P. & Kok, J. (2005a).** Probing direct interactions between CodY and the oppD promoter of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **187**, 512-521.

**den Hengst, C. D., van Hijum, S. A., Geurts, J. M., Nauta, A., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2005b).** The *Lactococcus lactis* CodY Regulon IDENTIFICATION OF A CONSERVED cis-REGULATORY ELEMENT. *J Biol Chem* **280**, 34332-34342.

**Detmers, F. J., Kunji, E. R., Lanfermeijer, F. C., Poolman, B. & Konings, W. N. (1998).** Kinetics and Specificity of Peptide Uptake by the Oligopeptide Transport System of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **37**, 16671-16679.

**Engberink, M. F., Schouten, E. G., Kok, F. J., van Mierlo, L. A., Brouwer, I. A. & Geleijnse, J. M. (2008).** Lactotriptides show no effect on human blood pressure results from a double-blind randomized controlled trial. *Hypertension* **51**, 399-405.

**Ettema, T. J., Brinkman, A. B., Tani, T. H., Rafferty, J. B. & Van der Oost, J. (2002).** A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes. *J Biol Chem* **277**, 37464-37468.

**Felis, G. E. & Dellaglio, F. (2007).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Intestinal Microbiol* **8**, 44.

**Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V. & Lortal, S. (2009).** prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3238-3249.

**Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. & Di Cagno, R. (2002).** Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42**, 223-239.

**Grant, G. A. (2006).** The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *J Biol Chem* **281**, 33825-33829.

**Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S. D., Renault, P. & Delorme, C. (2001).** Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched - chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **40**, 1227-1239.

**Hannon, J., Wilkinson, M., Delahunty, C., Wallace, J., Morrissey, P. & Beresford, T. (2003).** Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Int Dairy J* **13**,

313-323.

**Hartmann, R. & Meisel, H. (2007).** Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 163-169.

**Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. & Takano, T. (1996).** A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition* **64**, 767-771.

**Hebert, E. M., Raya, R. R. & De Giori, G. S. (2000).** Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5316-5321.

**Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P. & Addeo, F. (2008).** Characterization of the pattern of  $\alpha$ s1- and  $\beta$ -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3682-3689.

**Hendriksen, W. T., Bootsma, H. J., Estevão, S., Hoogenboezem, T., de Jong, A., de Groot, R., Kuipers, O. P. & Hermans, P. W. (2008).** CodY of *Streptococcus pneumoniae*: link between nutritional gene regulation and colonization. *J Bacteriol* **190**, 590-601.

**Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. & Recio, I. (2004).** Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J Chromatogr* **1049**, 107-114.

**Hickey, D. K., Kilcawley, K. N., Beresford, T. P., Sheehan, E. M. & Wilkinson, M. G. (2007).** Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *J Dairy Res* **74**, 9.

**Hirata, H., Nakamura, Y., Yada, H., Moriguchi, S., Kajimoto, O. & Takahashi, T. (2002).** Clinical effects of new sour milk drink on mild or moderate hypertensive subjects. *J New Rem & Clin* **51**, 61-69.

**Hirota, T., Nonaka, A., Matsushita, A., Uchida, N., Ohki, K., Asakura, M. & Kitakaze, M. (2011).** Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. *Heart and vessels* **26**, 549-556.

**Ignoul, S. & Eggermont, J. (2005).** CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **289**, C1369-C1378.

**Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M. & Sansawa, H. (2003).** Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric

acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition* **57**, 490-495.

**Inoue, K., Gotou, T., Kitajima, H., Mizuno, S., Nakazawa, T. & Yamamoto, N. (2009).** Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein. *J Biosci Bioeng* **108**, 111-115.

**Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B. & Speed, T. P. (2003a).** Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15-e15.

**Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer - Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. & Speed, T. P. (2003b).** Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264.

**Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. & Salminen, S. (2001).** Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition* **73**, 444s-450s.

**Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M. & Korpela, R. (2005).** *Lactobacillus helveticus* Fermented Milk Lowers Blood Pressure in Hypertensive Subjects in 24-h Ambulatory Blood Pressure Measurement. *American journal of hypertension* **18**, 1600-1605.

**Jauhiainen, T., Rönneck, M., Vapaatalo, H., Wuolle, K., Kautiainen, H. & Korpela, R. (2007).** *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces arterial stiffness in hypertensive subjects. *Int Dairy J* **17**, 1209-1211.

**Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. & Caen, J. (1986).** Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *European journal of biochemistry/FEBS* **158**, 379-382.

**Kajimoto, O., Aihara, K., Hirata, H., Takahashi, R. & Nakamura, Y. (2001a).** Hypotensive effects of the tablets containing lactotripeptides (VPP, IPP). *J Nutr Food* **4**, 51-61.

**Kajimoto, O., Nakamura, Y., Yada, H., Moriguchi, S., Hirata, H. & Takahashi, T. (2001b).** Hypotensive effects of sour milk in subjects with mild or moderate hypertension. *JOURNAL-JAPANESE SOCIETY OF NUTRITION AND FOOD SCIENCE* **54**, 347-354.

**Kawaguchi, K., Nakamura, T., Kamiie, J., Takahashi, T. & Yamamoto, N. (2012).** Accumulation of ACE Inhibitory Tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in Vascular Endothelial Cells. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **76**, 1792-1795.

**Kiernan, R., Beresford, T., O'Cuinn, G. & Jordan, K. (2000).** Autolysis of lactobacilli during Cheddar cheese ripening. *Irish journal of agricultural and food research*, 95-106.

**Kok, J. (1990).** Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol*

*Lett* **87**, 15-41.

**Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K. & Oki, T. (2001).** Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *JOURNAL-JAPANESE SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY* **48**, 44-50.

**Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W. N. (1996).** The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 187-221.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Lahov, E. & Regelson, W. (1996).** Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol* **34**, 131-145.

**Leenhouts, K. J., Kok, J. & Venema, G. (1990).** Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2726-2735.

**Lemos, J. A., Nascimento, M. M., Lin, V. K., Abranches, J. & Burne, R. A. (2008).** Global regulation by (p) ppGpp and CodY in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **190**, 5291-5299.

**Levdikov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L. & Wilkinson, A. J. (2006).** The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **281**, 11366-11373.

**Liu, F., Du, L., Du, P. & Huo, G. (2009).** Possible promoter regions within the proteolytic system in *Streptococcus thermophilus* and their interaction with the CodY homolog. *FEMS Microbiol Lett* **297**, 164-172.

**Liu, S.-T. & Hong, G.-F. (1998).** Three-minute G+ A specific reaction for DNA sequencing. *Anal Biochem* **255**, 158-159.

**Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R. A. & Klee, W. A. (1983).** Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry* **22**, 4567-4573.

**Maeno, M., Yamamoto, N. & Takano, T. (1996).** Identification of an Antihypertensive Peptide from Casein Hydrolysate Produced by a Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* **79**, 1316-1321.

**Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B. & other authors (2011).** CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, D225-D229.

**Martín-Hernández, M. C., Alting, A. C. & Exterkate, F. A. (1994).** Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of

*Lactobacillus helveticus* L89. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 828-834.

**Marugg, J. D., Meijer, W., van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P. G. & De Vos, W. (1995).** Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *J Bacteriol* **177**, 2982-2989.

**Meisel, H. & Schlimme, E. (1994).** Inhibitors of angiotensin-converting enzyme derived from bovine casein (casokinins).  *$\beta$ -casomorphins and related peptides: recent developments VCH-Weinheim, Germany*, 27-33.

**Meisel, H. & Bockelmann, W. (1999).** Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 207-215.

**Migliore-Samour, D., Floch, F. & Jolles, P. (1989).** Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J Dairy Res* **56**, 357-362.

**Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y. & Yamamoto, N. (2005).** Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition* **94**, 84.

**Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T., Nakamura, Y., Tochikubo, O. & Ueshima, H. (2004).** Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American journal of hypertension* **17**, 701-706.

**Mullally, M. M., Meisel, H. & FitzGerald, R. J. (1996).** Synthetic peptides corresponding to a-lactalbumin and b-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **377**, 259-260.

**Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. & Takano, T. (1995a).** Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* **78**, 777-783.

**Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. & Takano, T. (1995b).** Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci* **78**, 1253-1257.

**Namba, Y., Hidaka, Y., Taki, K. & Morimoto, T. (1981).** Effect of oral administration of lysozyme or digested bacterial cell walls on immunostimulation in guinea pigs. *Infect Immun* **31**, 580-583.

**Ohashi, T., Minamishima, Y., Yokokura, T. & Mutai, M. (1989).** Induction of resistance in mice against murine cytomegalovirus by cellular components of *Lactobacillus casei*. *Biotherapy* **1**, 89-95.

- Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T. & Shimizu, M. (2008). Producibility and digestibility of antihypertensive  $\beta$ -casein tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* **56**, 854-858.
- Ono, H., Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T. & Momose, H. (1997). Purification and characterization of a cell-wall associated proteinase of *Lactobacillus helveticus* CP53. *Milchwissenschaft* **52**, 373-377.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L. & Jovanovic, G. (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5802-5811.
- Paštar, I., Begović, J., Lozo, J., Topisirović, L. & Golić, N. (2007). Casitone-dependent transcriptional regulation of the prtP and prtM genes in the natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *Folia Microbiol* **52**, 577-584.
- Pederson, J. A., Mileski, G. J., Weimer, B. C. & Steele, J. L. (1999). Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J Bacteriol* **181**, 4592-4597.
- Petranovic, D., Guédon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D. & Renault, P. (2004). Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol Microbiol* **53**, 613-621.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45-e45.
- Pripp, A. H. (2008). Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & nutrition research* **52**.
- Qian, Z.-Y., Jollès, P., Migliore-Samour, D. & Fiat, A.-M. (1995a). Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1243**, 25-32.
- Qian, Z.-Y., Jollès, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F. & Fiat, A.-M. (1995b). Sheep  $\kappa$ -casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1244**, 411-417.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.-W. & Sonenshein, A. L. (2001). *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* **15**, 1093-1103.

- Ritt, J. F., Remize, F., Grandvalet, C., Guzzo, J., Atlan, D. & Alexandre, H. (2009). Peptidases specific for proline - containing peptides and their unusual peptide - dependent regulation in *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* **106**, 801-813.
- Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S. & Gagnaire, V. (2011). Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int J Food Microbiol* **146**, 1-13.
- Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. In *Bioactive components of milk*, pp. 295-317: Springer.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*: Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sano, J., Ohki, K., Higuchi, T., Aihara, K., Mizuno, S., Kajimoto, O., Nakagawa, S., Kajimoto, Y. & Nakamura, Y. (2005). Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J Med Food* **8**, 423-430.
- Sato, K. (1984). Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: role of macrophages. *Infect Immun* **44**, 445-451.
- Scolari, G., Vescovo, M., Zacconi, C. & Vescovi, F. (2006). Extraction and Partial Characterization of Proteolytic Activities from the Cell Surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2. *J Dairy Sci* **89**, 3800-3809.
- Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T. & Korpela, R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension: a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* **57**, 124-127.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T. & Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition* **77**, 326-330.
- Shahani, K. M. & Chandan, R. C. (1979). Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *J Dairy Sci* **62**, 1685-1694.
- Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M., Otsuka, Y. & Yamazaki, S. (1998). Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Lett Appl Microbiol* **26**, 407-411.
- Siezen, R. J. (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, pp. 139-155: Springer.
- Simone, C. D., Vesely, R., Negri, R., Salvadori, B. B., Zanzoglu, S., Cilli, A. & Lucci, L. (1987).



Enhancement of immune response of murine Peyer's patches by a diet supplemented with yogurt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **9**, 87-100.

**Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G., Beresford, T. & Ross, R. (2010).** Invited review: *Lactobacillus helveticus*—A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J Dairy Sci* **93**, 4435-4454.

**Smeianov, V. V., Wechter, P., Broadbent, J. R., Hughes, J. E., Rodríguez, B. T., Christensen, T. K., Ardö, Y. & Steele, J. L. (2007).** Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2661-2672.

**Smit, G., Smit, B. A. & Engels, W. J. (2005).** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 591-610.

**Tani, F., Shiota, A., Chiba, H. & Yoshikawa, M. (1994).** Serophin, an opioid peptide derived from serum albumin.  *$\beta$ -casomorphins and related peptides: recent developments VCH-Weinheim, Germany*, 49-53.

**Taranto, M., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A. & Valdez, G. (2000).** Effect of *Lactobacillus reuteri* on the Prevention of Hypercholesterolemia in Mice. *J Dairy Sci* **83**, 401-403.

**Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. & Kawase, K. (1991).** Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci* **74**, 4137-4142.

**Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350-4354.

**Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M., Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L. & Nissinen, A. (2004).** Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of human hypertension* **18**, 795-802.

**Ueno, K., Mizuno, S. & Yamamoto, N. (2004).** Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. *Lett Appl Microbiol* **39**, 313-318.

**van der Zander, K., Bots, M. L., Bak, A. A., Koning, M. M. & de Leeuw, P. W. (2008).** Enzymatically hydrolyzed lactotriptides do not lower blood pressure in mildly hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition* **88**, 1697-1702.

**van Mierlo, L. A., Koning, M. M., van der Zander, K. & Draijer, R. (2009).** Lactotriptides

do not lower ambulatory blood pressure in untreated whites: results from 2 controlled multicenter crossover studies. *The American journal of clinical nutrition* **89**, 617-623.

**Varmanen, P., Vesanto, E., Steele, J. L. & Palva, A. (1994).** Characterization and expression of the *pepN* gene encoding a general aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiol Lett* **124**, 315-320.

**Vesanto, E., Savijoki, K., Rantanen, T., Steele, J. L. & Palva, A. (1995).** An X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (*pepX*) gene from *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* **141**, 3067-3075.

**Xu, J.-Y., Qin, L.-Q., Wang, P.-Y., Li, W. & Chang, C. (2008).** Effect of milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition* **24**, 933-940.

**Yamaguchi, N., Kawaguchi, K. & Yamamoto, N. (2009).** Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *Eur J Pharmacol* **620**, 71-77.

**Yamamoto, N., Akino, A. & Takano, T. (1993).** Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of biochemistry* **114**, 740-745.

**Yamamoto, N., Akino, A. & Takano, T. (1994a).** Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* **77**, 917-922.

**Yamamoto, N., Akino, A. & Takano, T. (1994b).** Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **58**, 776-778.

**Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. & Shishido, K. (1995).** Presence of Active and Inactive Molecules of a Cell Wall-Associated Proteinase in *Lactobacillus helveticus* CP790. *Appl Environ Microbiol* **61**, 698-701.

**Yamamoto, N. & Takano, T. (1997).** Maturation Factor for the Activation Process of an Extracellular Proteinase in *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* **80**, 1949-1954.

**Yamamoto, N., Ono, H., Maeno, M. & Takano, T. (1998).** Immunological classification of the proteinase in *Lactobacillus helveticus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1228-1230.

**Yamamoto, N., Shinoda, T. & Takano, T. (2000).** Molecular cloning and sequence analysis of a gene encoding an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **64**, 1217-1222.

**Yamamoto, N. (2011).** Antihypertensive Metabolites from Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid*

*Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*, 223.

**Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F. & Fukushima, Y. (2006).** Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. *British Journal of Nutrition* **95**, 303-312.

**Yin, J., Garen, G., Garen, C. & James, M. N. (2011).** Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of Rv3002c, the regulatory subunit of acetolactate synthase (IlvH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **67**, 933-936.

**Yokokura, T., Nomoto, K. & Shimizu, T. (1986).** Enhancement of hematopoietic response of mice by subcutaneous administration of *Lactobacillus casei*. *Infect Immun* **52**, 156-160.

**Yoshizawa, M., Maeda, S., Miyaki, A., Misono, M., Choi, Y., Shimojo, N., Ajisaka, R. & Tanaka, H. (2009).** Additive beneficial effects of lactotripeptides and aerobic exercise on arterial compliance in postmenopausal women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **297**, H1899-H1903.

**Zucht, H.-D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H.-J. & Forssmann, W.-G. (1995).** Casocidin-I: a casein- $\alpha_{s2}$  derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett* **372**, 185-188.

大澤一仁、内田直人、水野征一、中村康則、大木浩司、横越英彦 (2012) 「記憶力改善作用を有する *Lactobacillus helveticus* 発酵乳由来ペプチドの同定」 第 64 回日本生物工学会大会

## 論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* における蛋白質分解系遺伝子の発現調節に関する研究

氏 名 若井 丈人

### 1. 背景・目的

一般的に乳酸菌は、多くのアミノ酸を自ら合成することができず、その増殖には多種類のアミノ酸の供給が必要である。一方、乳内には遊離アミノ酸が少ないため、乳酸菌は乳内で増殖するために自身が持つ蛋白質分解系によって乳中の蛋白質を分解し、生じたペプチドやアミノ酸を窒素源として利用することで生育している。

*Lactobacillus helveticus* 種は、乳酸菌の中で最も高い蛋白質分解活性を有する。乳中蛋白質からのペプチド生産性も同様に高く、多種多様で多量のペプチドやアミノ酸を遊離することができる。*L. helveticus* 種の高い蛋白質分解活性はチーズの熟成のみならず、機能性ペプチドの高生産性という面からも注目されるようになっている。我々は機能性ペプチドの中でも特に、血圧降下作用を有するトリペプチドである VPP、IPP の研究を詳細に行い、実用化へと至っている。一方で、血圧降下ペプチドをさらに強化した発酵乳の開発を目的とし、VPP、IPP の生産性の高い乳酸菌株の育種・改良、および発酵方法の検討を行ってきたが、25%以上の理論収量を得ることは極めて困難であった。その理由として、*L. helveticus* 種の蛋白質分解系についての網羅的な解析が十分でないために代謝解析などについての知見が不足していること、また *L. helveticus* 種の高い蛋白質分解活性が発酵乳内に蓄積されたペプチドによって顕著に抑制されることなどが考えられた。

本研究では、乳酸菌群のなかで蛋白質分解能やペプチド生産性の高い *L. helveticus* 種のうち、特に菌体外プロテイナーゼ活性が高く、機能性ペプチドの生産性が高い *L. helveticus*

CM4 株の蛋白質分解系の解明を目的とした。さらに、その蛋白質分解活性がアミノ酸の存在により負のフィードバック制御をうけることに着目し、その制御機構の解析を行った。具体的には、全ゲノム配列解読による蛋白質分解系遺伝子群の網羅的な解析と、培地中のペプチドやアミノ酸濃度に応じた蛋白質分解系遺伝子転写制御機構の解明、さらには機能性ペプチド産生における関与遺伝子群ならびに機能性ペプチド生産性改良への技術情報を得ることを目的とした。

## 2. *L. helveticus* CM4 株のゲノム解析と比較ゲノムによる血圧降下ペプチド産生遺伝子群の推定

*L. helveticus* CM4 株のゲノム解析を行い、全蛋白質分解系遺伝子群を検索した。その結果、CM4 株ゲノムには 2 種類の菌体外プロティナーゼと、26 種類の菌体内ペプチダーゼが存在することを明らかにした。また、ゲノム配列が公開されている *L. helveticus* DPC4571 株との比較解析によって、両株の菌体内ペプチダーゼ遺伝子群の相同性は高いものの、菌体外プロティナーゼには大きな違いが認められることが判明した。菌体内ペプチダーゼについては、それぞれ 26 種類の遺伝子が両株に確認され、高い相同性を示した。一方、CM4 株に存在する 2 種類の菌体外プロティナーゼ遺伝子 (*prtY*, *prtH2*) については、DPC4571 株では *prtY* 遺伝子は存在せず、また *prtH2* 遺伝子は途中で終止コドンが挿入されていることから偽遺伝子である可能性が示された。さらに菌体外プロティナーゼ活性と基質切断点、および血圧降下ペプチド産生量を両株で比較すると、CM4 株は DPC4571 株と比べて菌体外プロティナーゼ活性が高く、かつ血圧降下ペプチドの産生量も多いことが明らかとなった。したがって、血圧降下ペプチド産生における菌体外プロティナーゼの重要性が改めて示された。さらに、血圧降下ペプチドの切り出しに関与すると推定される CM4 株の菌体内ペプチダーゼについても、アミノペプチダーゼ群 (N 末端の切り出し)、エンドペプチダーゼ群 (C 末端の切り出し)、X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼ (XPDP; X-Pro 配列の切り出し) に分類される遺伝子の存在と配列を明らかにすることができた。

## 3. アミノ酸による *L. helveticus* CM4 株の蛋白質分解系の発現制御解析

*L. helveticus* 種において、培地中の過剰なアミノ酸やペプチドによって蛋白質分解系の活性が抑制をうけることが示唆されていたが、その調節機構は明らかとなっていなかった。そこで、本研究で得られた *L. helveticus* CM4 株のゲノム情報を活用し、全遺伝子に対応した DNA チップを作製することで、CM4 株発酵乳中へのアミノ酸やペプチド混合物の添加が、蛋白質分解系遺伝子群の転写量に与える影響を詳細に解析した。その結果、乳培地中へのペプチド混合物の添加によって、多くの蛋白質分解系遺伝子群の転写が顕著に抑制されるのと同時に、菌体外プロティナーゼ活性ならびに血圧降下ペプチド産生量が著しく低下した。また、分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) を含む単独のアミノ酸の乳培地への添加が血圧降下ペプチド産生量へ与える影響を評価した結果、CM4 株の菌体内アミノ酸濃度に依存して、蛋白質分解系の転写活性が抑制されている可能性が示唆された。従って、培地中のア

ミノ酸による蛋白質分解系の転写制御が、血圧降下ペプチドの生産をも抑制するものと推察された。

#### 4. アミノ酸に応答する蛋白質分解系遺伝子の転写調節因子の解析

菌体内アミノ酸濃度に依存した転写調節機構の解明を目指し、蛋白質分解系遺伝子上流領域にアミノ酸濃度依存的に結合する転写調節因子の探索を実施した。遺伝子上流領域に結合する蛋白質の単離・同定を試み、26 kDa の CBS ドメインを有する蛋白質 (CBSDP) を結合蛋白質として同定した。DNA 結合アッセイにより、この蛋白質が蛋白質分解系遺伝子上流領域に結合すること、またその結合が BCAAs の添加によって促進されることが明らかになった。さらに、形質転換が困難な *L. helveticus* 種の代替として大腸菌を用いて、26 kDa 蛋白質遺伝子とレポーター遺伝子として転写制御が期待できる *pepV* 遺伝子を共導入し、BCAAs 添加が *pepV* 遺伝子発現に与える影響を評価した。その結果、BCAAs を含む培地では 26 kDa 蛋白質の発現が *pepV* 遺伝子の転写を抑制する可能性を示唆することができた。以上より、単離した 26 kDa 蛋白質は新規な BCAAs 応答性転写制御因子であることが示され、BCAA Responsive Transcriptional Regulator (BCARR) としてデータベースに登録した。さらに、BCARR の結合 DNA 配列の探索のため、BCARR 結合が確認された遺伝子上流配列から共通モチーフ検索を行い、さらに小断片化した DNA プローブを用いたゲルシフトアッセイを行うことで、推定結合モチーフを含む DNA 配列への BCARR 結合性が非常に高いことを明らかにすることができた。

#### 5. まとめ

以上、本研究で明らかにした *L. helveticus* CM4 株における蛋白質分解系の全体像より、血圧降下ペプチド VPP、IPP の生産機構について、以下のように推察された。

(I) 最初に細胞壁結合菌体外プロテイナーゼによって、乳中の主要蛋白質であるカゼインが切断されオリゴペプチドが遊離する。(II) 切断されたオリゴペプチドは、オリゴペプチドトランスポーターを介して菌体内に取り込まれ、(III) 菌体内の多くのペプチダーゼによってペプチド、アミノ酸に分解される。この過程で VPP、IPP の前駆ペプチドは、エンドペプチダーゼ (PepO1、PepO2、PepT2 など)、アミノペプチダーゼ (PepCE など)、XPDP (PepX) などによって分解され、VPP、IPP が切り出される。(IV) 一方、菌体内に蓄積した BCAAs は濃度が上昇すると BCARR と結合し、(V) BCAAs と結合した BCARR は蛋白質分解系遺伝子上流域に存在する BCARR 結合配列に結合し、蛋白質分解系遺伝子群の転写を抑制する。(VI) その結果、蛋白質分解活性が負のフィードバックを受け抑制され、蛋白質分解系の過度の発現を抑える。その結果、VPP、IPP の産生も同時に抑制されてしまう。

このように、*L. helveticus* CM4 株において蛋白質分解系遺伝子群の発現が、菌体内アミノ酸濃度に応じて転写レベルで効率的に制御されていることが示され、その転写調節に深く関与する因子 BCARR が、本研究において初めて明らかになった。

本研究で得られた知見より、転写制御因子の改変を施すことでさらなる蛋白質分解活性が高い乳酸菌株の育種・スクリーニングや、蛋白質分解を促進する発酵制御法開発につながる可能性がある。これら *L. helveticus* 種の蛋白質分解系遺伝子群の発現制御における基礎的知見は、血圧降下ペプチドを含む様々な機能性ペプチドの生産強化や産業利用において、極めて重要な情報になりうると考えられる。

### 発表論文

1. Wakai, T., Yamaguchi, N., Hatanaka, M., Nakamura, Y. & Yamamoto, N., *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 133-137 (2012)
2. Wakai, T., Shinoda, T., Uchida, N., Hattori, M., Nakamura, Y., Beresford, T., Ross, R. P. & Yamamoto, N., *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 246-252 (2013)
3. Wakai, T., & Yamamoto, N., *PLoS One*, **8**, e75976 (2013)

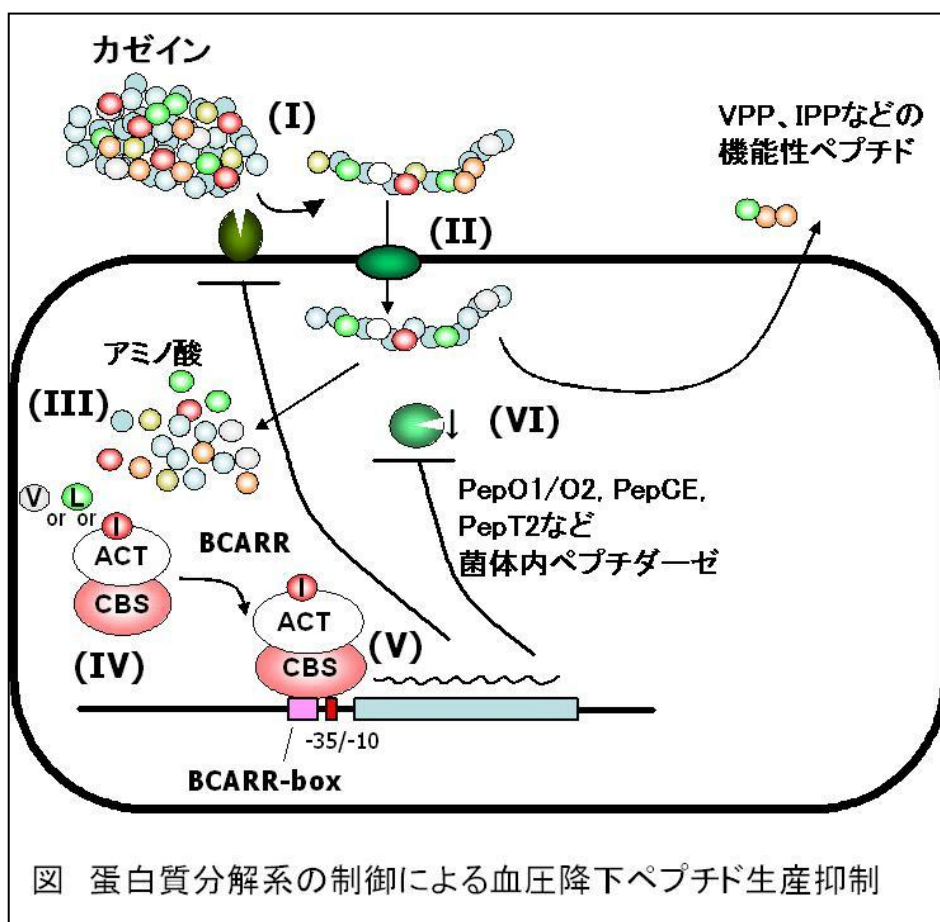


図 蛋白質分解系の制御による血圧降下ペプチド生産抑制

## 謝辞

本研究の実施および論文作成にあたり、幅広い視点よりご指導、ご鞭撻を承りました東京大学大学院農学生命科学研究科 三坂 巧 准教授、および東京大学名誉教授・特任教授 阿部 啓子 教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なご指導とご助力を承りましたカルピス株式会社 研究戦略部 山本 直之 博士に心から感謝申し上げます。

共同研究者として御協力いただきました、カルピス株式会社 中村 康則 博士、篠田 直氏、畑中 美咲氏、内田 直人氏、元カルピス株式会社 山口 直矢氏、*L. helveticus* DPC4571 株をご好意で提供し、ご助言を承りましたアイルランド コーク大学 Paul Ross 博士、Tom Beresford 博士、ゲノム解読に多大な御協力を賜りました東京大学大学院 服部 正平 教授に心から感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御協力および貴重なご助言、激励を承りました、カルピス株式会社 発酵応用研究所 宮崎 博 所長、大木 浩司 次長、弘田 辰彦氏、柳原 沙恵氏、加藤 慎二氏、加藤 さやか氏、山田 和久氏をはじめ、同研究所の皆様心より感謝申し上げます。

2013年10月

若井 丈人