

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イナーゼと、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、菌体外プロテイ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イナーゼ遺伝子 (*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イ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イナーゼ活性が高く、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イ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 (XPDAP; 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、菌体外プロテイ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)、XPDAP (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*, in press (2013)

