

乳酸菌の Dpr 蛋白質を介した酸素耐性機構の解明並びに Dpr を利用した細菌の育種と鉄イオン除去技術開発

神尾 好是

(東北大学大学院 農学研究科応用生命科学専攻)

乳酸菌は、カタラーゼを持たないにもかかわらず酸素の存在下で生育できる殆ど唯一の生物である。このため乳酸菌の酸素耐性機構、特に過酸化物質耐性機構は興味深い研究対象とされてきた。先に我々は、乳酸菌の一種である *Streptococcus mutans* から、カタラーゼ代替のペルオキシダーゼとして 2 成分性のペルオキシダーゼであるアルキルハイドロペルオキシドレダクターゼ (AhpR)を見出すとともに、*S. mutans* の *ahpR* 欠損株を作製した。*ahpR* 欠損株は、AhpR に依存したペルオキシダーゼ活性を消失したが、野生株と同等の過酸化物質耐性を保持していた。この結果から、我々は *S. mutans* には AhpR の欠損を補償するより主要な因子が存在しているのではないかと考え、新たに過酸化物質耐性因子の取得を試みた。そして大腸菌 *ahpR* 欠損株の過酸化物質耐性を復帰させる遺伝子として、*dpr* (Dps like peroxide resistance gene) 遺伝子を見出した。*dpr* 欠損株は好気条件下でコロニーを形成できず、*dpr*, *ahpR* の 2 遺伝子欠損株及び *dpr*, *sod* の 2 遺伝子欠損株では液体培地でも生育できないことが明らかとなった。

dpr 遺伝子にコードされるアミノ酸配列は 20~40%と低いながらも、Dps (DNA binding protein starved cells) ファミリーのタンパク質と相同性を示した。Dps は、大腸菌の定常期の細胞内に蓄積する非特異的 DNA 結合タンパク質である。その後の研究により、Dps ホモログは原核生物に広く局在すること、Dps ファミリーの中には、多様な機能を持つ分子種が含まれることが明らかとなった。Dps ファミリーの分子には、DNA 結合能を持つもの、鉄結合能を持つもの、白血球の活性化因子として機能するもの、繊毛を構成するものなどがある。本研究では、Dpr 分子がどのように *S. mutans* に酸素耐性を付与しているか明らかとするため、*dpr* 遺伝子産物の取得と解析を行った。

好氣的に培養した *S. mutans* の菌体約 10 g から、ハイドロキシアパタイトを用いたバッチ法と 3 種のカラムクロマトグラフィーを用いて、精製度で約 50 倍、精製標品として約 2.4mg の Dpr 蛋白質を得た。Dpr 分子は、SDS-PAGE で 20 kDa、沈降平衡法で 223 kDa、動的光散乱法で 292 kDa の分子量を示したことから、約 12 量体からなる複合体を形成していると考えられた。また、この Dpr の複合体は直径約 9.2 nm の球状の粒子として顕微鏡で観察され、鉄結合蛋白質であるフェリチン(直径 12.5 nm)と類似した形状であった。ICP-MASS を用いて、金属元素種の同定と定量を行った結果、精製した Dpr 分子には複合体当たり鉄と亜鉛がそれぞれ 27.8、10.5 個含まれていた。Dpr 精製標品の鉄および亜鉛との結合能について調べた結果、その最大積載量は鉄が複合体当たり 480 個、亜鉛が 11.4 個であった。

Dpr が属する Dps ファミリーの蛋白質では、DNA との非特異的な結合能が報告されている。そこ

で、Dpr の DNA 結合能について検討した。大腸菌の Dps をポジティブコントロールとして用い、Dpr と pUC118、 λ DNA、*S. mutans* ゲノム DNA との結合能をゲルシフトアッセイを用いて検討したが、Dpr はいずれの DNA とも結合しなかった。また、抗酸化酵素活性である、SOD 活性とカタラーゼ活性についても検討したが、いずれの活性も検出されなかった。

以上の結果から、Dpr 分子はいわゆるフェリチンのような鉄結合蛋白質の一種であると考えられた。鉄イオンは、フェントン反応 ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) で知られるように、最も反応性の高い活性酸素種であるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を触媒する。従って、推定される Dpr 分子の機能は、生体内の遊離の鉄イオンのキレート作用によるヒドロキシルラジカルの生成抑制である。そこで、Dpr 分子が鉄イオンに依存したヒドロキシルラジカルの生成を抑制しうるか否か無細胞の実験系を用い検討した。その結果、 Fe^{2+} の添加によるヒドロキシルラジカルの産生を Dpr 分子は非常に効果的に抑制することが明らかとなった。100 nM の Dpr は、10 mM の Fe^{2+} に依存したヒドロキシルラジカルの生成を 92.6% 抑制した。また、鉄をあらかじめ結合した Dpr ではヒドロキシルラジカルの生成抑制能が有意に低下したことから、ラジカルの生成抑制は Dpr の鉄結合能によると考えられた。

Dpr が属する Dps ファミリーの蛋白質では、DNA との非特異的な結合が報告されており、DNA と Dps 蛋白の強固な結合自体が DNA を過酸化水素から保護しているとされているが、Dpr には DNA との結合能は認められなかった。SOD 活性や *Synechococcus* の DpsA で報告されているカタラーゼ活性も認められなかったことから、Dpr 分子の酸素耐性能は、鉄結合能に由来すると考えられ、実際に鉄イオンに依存したヒドロキシルラジカルの産生を効果的に抑えることができた。この結果は、一連の *dpr* 欠損株の好気条件下での生育阻害が、ヒドロキシルラジカル由来するとした我々の前報の仮説を支持するものである。

また、Dpr は球状のフェリチン様の 12 量体を形成する分子であった。バクテリアには、ヘムを含むバクテリオフェリチンとヘムを含まないノンヘムフェリチンが存在し、いずれも 24 量体からなる球状の複合体を形成する。乳酸菌では、いずれのホモログと考えられる遺伝子も見つかっていないが、Dpr ホモログは乳酸菌のゲノムに広く存在する。従って、Dpr は乳酸菌におけるフェリチン様の鉄結合蛋白質として機能することで、鉄が触媒するヒドロキシルラジカルの発生を防ぎ、カタラーゼやヘム・ペルオキシダーゼを持たない乳酸菌に酸素耐性を付与していると考えられる。