

氏 名 (本 國 籍)	賀 建 龍 (中華人民共和國)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 5 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 4 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Acquired Tolerance to Oxygen Stress in <i>Bifidobacterium longum</i> 105-A by Heterologous Expression of Catalase Gene (ビフィズス菌の酸素ストレス耐性における外来カタラーゼ遺伝子発現の影響に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教 授 高見澤 一 裕 副査 岐阜大学 教 授 鈴 木 徹 副査 静岡大学 教 授 小 川 直 人

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

プロバイオティクスとしてビフィズス菌は、腸内感染症から保護をする。ヨーグルト、発酵乳、および栄養補助食品を含む様々な食品や治療薬で使用されている。高い効果を得るためには、腸管に達するまで生きるビフィズス菌が生存している必要がある。しかし、ビフィズス菌は偏性嫌気性菌であるため酸素に対して弱く、その製造や保存が困難である。ビフィズス菌はオキシダーゼの機能を持ち、過酸化水素を生産するが、過酸化水素はビフィズス菌の好気性増殖を阻害する主な原因と考えられている。NADH ペルオキシダーゼがビフィズス菌で発見され、thiol peroxidase や alkyl hydroperoxide reductase や peptide methionine sulfoxide reductase といった何種類かのペルオキシダーゼが予測されたが、これらのペルオキシダーゼは好气的条件下でビフィズス菌によって生成される過酸化水素を分解することはできなかった。さらに、我々は、*B. longum* 105-A で過酸化水素消去活性も検出することができなかった。

スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)は抗酸化システムを構成している。GPX およびカタラーゼは過酸化水素を分解する酵素である。GPX は主に真核生物で研究されているが、原核生物における GPX の研究は少ない。ビフィズス菌では GPX の遺伝子は検出されていない。さらに、ビフィズス菌はグルタチオン合成経路も持っていない。カタラーゼは好気性細菌では一般的に存在が明らかになっているが、ビフィズス菌を含むほぼ全ての嫌気性細菌には存在しない。ヘムカタラーゼとマンガンカタラーゼの2種類のカタラーゼが知られており、他の細菌に発現し、生存率を改善するために使用されている。

本研究では、*B. longum* 105-A の酸化ストレス耐性における枯草菌のヘムカタラーゼの発現の影響を検討した。比較として、*B. longum* 培地のカタラーゼ追加影響もテストした。(A) 下記の結果：

(1)、過酸化水素 (4.4mM) 添加 1 時間後、増殖期と安定期の *B. longum* (カタラーゼ+) の生存率は *B. longum* に比べ 120 倍と 103 倍に大幅に増加した。増殖期の細胞は安定期の細胞より過酸化水素の影響を受けやすかった。

(2) 好氣的培養条件下では、*B. longum* (カタラーゼ+) の成長はある程度阻害され、*B. longum* はほぼ停止した。*B. longum* は 12 時間後も生存はしていたが、細胞の成長は急速に低下し始め、24 時間後にはほぼ培養不可能となった。しかし、*B. longum* (カタラーゼ+) は 24 時間では ( $1 \times 10^7$  CFU) を高い生存率を持ち 48 時間後に培養不可能となった。

(3) 培地中に発生した過酸化水素の測定を行った。*B. longum* に過酸化水素の蓄積は、18 時間にわたって見られ、0.1mM でピークに達した。*B. longum* (カタラーゼ-) では安定期まで蓄積が見られなかった。

(4) *B. longum* が培養不可能となったが、細胞膜を維持している可能性があるかどうかを調べた。好気培養 24 時間後に、*B. longum* は '安定' しており、 $1 \times 10^7$  '生存' 細胞/ mL を維持したが、実際の生存率は  $10^{1-2}$  CFU であった。

(5) カタラーゼ添加培地における *B. longum* とカタラーゼの発現をさせた *B. longum* を比較した。培地にカタラーゼ (100 または 3000U/mL) を添加した時、*B. longum* 改善が見られたが、カタラーゼ添加濃度には関係がなかった。興味深いことに、好気で 18 時間培養した時、添加したカタラーゼ濃度は発現させたカタラーゼ濃度よりもかなり高かったにもかかわらず、カタラーゼ添加した *B. longum* と発現させた *B. longum* (カタラーゼ+) の生菌数は類似していた。カタラーゼ添加した *B. longum* は 36 時間培養後に培養不可能になったが、発現させた *B. longum* (カタラーゼ+) は 48 時間で培養不可能になった。

カタラーゼの添加やカタラーゼの発現は酸化ストレスからビフィズス菌を守ることができるとが明らかとなったが、カタラーゼを発現させた時よりカタラーゼを添加した時の方が保護効果は弱かった。しかし、*B. longum* で発現したカタラーゼ活性はまだ十分ではなかった。タンパク質の高レベルの発現は、転写や翻訳、タンパク質の分解を含む多くの要因に関係がある。そこで、*B. longum* の発現レベルを向上させるために、転写と翻訳レベルを向上させることを試みた。

(B) *Gap* と *Hup* のプロモーターは、ビフィズス菌において強い活性を持つことが報告されている。*B. longum* のカタラーゼ転写産物の定量 PCR の結果により、増殖期と安定期の転写量が近かった。カタラーゼ活性の強さも類似していた。これは、この方法では活性が増加していないことを示している。将来、プロモーターの最適化を試みる必要がある。

(C) 翻訳は発現において重要なプロセスであり、4 つのフェーズに分かれている：開始、伸長、終結、およびリボソームリサイクリングである。これらのフェーズのなかで、翻訳開始が一番重要である。多くの結果から、翻訳開始にとって、RBS の塩基配列やスペーサーが重要である事が示されている。しかし、RBS に関する研究は主に大腸菌で行われており、ビフィズス菌の情報は非常に限られている。そこで、効率的な RBS 配列とスペーサーの長さを調査するためにインフォマティクスと実験的評価を行った。

(1) *B. longum* の CDS の開始コドン上流-11-18 から 5 nt と 6 nt と 7nt のシーケンスを数えた。ほとんどすべてのシーケンスは *B. longum* の 16S rRNA の 3'末端に相補する、AAGGAG であり、6 nt なかで最も高い頻度を示した。*B. longum* の 16S rRNA の 3'末端 (5'...CACCUCCUUUCU-3') 配列情報から、AAGGAG の 6 nt スペーサーを中心に、5 nt から 11nt の様々な長さの RBS を設計した。これらのシーケンスを発現ベクターに導入し、活性を検定した。RBS は、統計データと一致し AAGGAG (6 nt) のときに最大の活性を有していた。RBS が 6 nt より長いとき、活性は減少した。原因としてリボソームと mRNA の結合が強すぎ、翻訳を開始するためリボソームの解放を妨げているという可能性が考えられる。*B. adolescentis* ATCC15703 と *B. bifidum* PRL2010、*B. animalis* subsp. *lactis* AD011 の RBS 配列の頻出回数を調べたところ、同じ方法で、6 nt では AAGGAG が最も多く使用されているシーケンスだった。これら

の結果により、AAGGAG が *Bifidobacteria* における標準的な RBS 配列であることが明らかとなった。

(2) *B. longum* と他の数種のビフィズス菌における AAGGAG と開始コドンの間のスペーサーを分析した。*B. longum* NCC2705 のスペーサーの長さは主に 5 nt~8 nt で、他のビフィズス菌でも類似の結果が得られた。我々は、開始コドンと RBS の間が 4 nt~9 nt を様々な長さのスペーサーを持つ RBS (GAAGGA 又は AAGGAG) を設計した。その結果、5 nt スペーサーの時に活性が最も強かった。4 nt スペーサーは活性が低く、5 nt スペーサーの活性のわずか 15%~30% しかなかった。

以上の結果により、*B. longum* における、効率的な RBS の配列は AAGGAG であり、最も適したスペーサーは 5 nt であることが示された。実験結果とインフォマティクスの結果は相関を示したことから、我々はこれらの予測方法は他の細菌にも適用できると考える。

## 審 査 結 果 の 要 旨

プロバイオティクスとしてビフィズス菌は、腸内感染症から保護をする。ヨーグルト、発酵乳、および栄養補助食品を含む様々な食品や治療薬で使用されている。しかし、ビフィズス菌は偏性嫌気性菌であるため酸素に対して弱く、その製造や保存が困難である。ビフィズス菌はオキシダーゼの機能を持ち、過酸化水素を生産するが、過酸化水素はビフィズス菌の好気性増殖を阻害する主な原因と考えられている。

賀建龍は本研究において、以下の 2 点について研究を行った

(1) *B. longum* 105-A の酸化ストレス耐性における枯草菌のヘムカタラーゼ (*katE*) の発現の影響を検討した。その結果、*katE* 遺伝子はビフィズス菌内で発現し、培地にヘムを加える事により活性を示した。この、カタラーゼ発現により、ビフィズス菌は、好氣的環境でも増殖することが出来ることが確認された。外部からカタラーゼを加える事によってもある程度、酸素耐性を付与する事が出来たが、細胞内で発現したカタラーゼに比べその効果は若干低いものであった。

次に、*B. longum* 株ににおける、高効率の遺伝子発現を実現するために、翻訳開始に必要な構造遺伝子上流部分のリボゾーム結合部位の配列と、結合部位と開始コドン間のスペーサー配列の検討を行った。*B. longum* の CDS の開始コドン上流-1~-18 に高頻度で出現する 6 塩基モチーフを検索したところ、AAGGAG が最も高い頻度を示した。*B. longum* の 16S rRNA の 3' 末端 (5' -...CACCUCUUUCU -3') 配列情報から、AAGGAG の 6 nt スペーサーを中心に、5 nt から 11nt の様々な長さの RBS を設計した。これらのシーケンスを発現ベクターに導入し、活性を検定した。RBS は、統計データと一致し AAGGAG (6 nt) のときに最大の活性を有していた。RBS が 6 nt より長いとき、活性は減少した。*B. adolescentis* ATCC15703 と *B. bifidum* PRL2010、*B. animalis* subsp. *lactis* AD011 の RBS 配列の頻出回数を調べたところ、同じ方法で、6 nt では AAGGAG が最も多く使用されているシーケンスだった。これらの結果により、AAGGAG が *Bifidobacteria* における標準的な RBS 配列であることが明らかとなった。

(2) *B. longum* と他の数種のビフィズス菌における AAGGAG と開始コドンの間のスペーサーを分析した。*B. longum* NCC2705 のスペーサーの長さは主に 5 nt~8 nt で、他のビフィズス菌でも類似の結果が得られた。我々は、開始コドンと RBS の間が 4 nt~9 nt を様々な長さのスペーサーを持つ RBS (GAAGGA 又は AAGGAG) を設計した。その結果、5 nt スペーサーの時に活性が最も強かった。4 nt スペーサーは活性が低く、5 nt スペーサーの活性のわずか 15%~30% しかなかった。

以上の結果により、*B. longum* における、効率的な RBS の配列は AAGGAG であり、最も適

したスペーサーは5 ntであることが示された。実験結果とインフォマティクスの結果は相関を示したことから、我々はこれらの予測方法は他の細菌にも適用できると考える。

これらの研究結果は、以下の二つの論文として投稿し、受理された。

- 1) **Jianlong He, Kouta Sakaguchi, Tohru Suzuki (2012) Determination of the ribosome-binding sequence and spacer length between binding site and initiation codon for efficient protein expression in *Bifidobacterium longum* 105-A, J. Biosci. Bioeng., in press.**
- 2) **Jianlong He, Kouta Sakaguchi, Tohru Suzuki (2012) Acquired Tolerance to Oxidative Stress in *Bifidobacterium longum* 105-A via the Expression of a Catalase Gene, Appl. Environ. Microbiol., in press.**

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた