

減塩食品における保存作用代替物質の開発に向けた基盤研究

～普遍的 Na⁺感受性因子の同定～

黒田 照夫

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

概要 食品の保存において、塩の添加は重要である。塩、特に Na⁺ は細菌の増殖・生存に必須であるが、過剰の Na⁺ は生育阻害を引き起こす。しかしなぜ Na⁺ によって生育阻害が起こるのかはよく分かっていない。そこで我々は、細胞内 Na⁺ の上昇によってどのような遺伝子発現変化が起き、そして機能が直接阻害されるタンパク質 (Na⁺ 感受性タンパク質) が何かを同定することを目指した。

本来、細胞内 Na⁺ 濃度は Na⁺/H⁺ アンチポーターや呼吸鎖 Na⁺ ポンプなどの調節システムにより一定に保たれており、生きたままの状態では細胞内 Na⁺ 濃度を自由に变化させることは極めて難しい。しかし、これまでに我々は Na⁺ 感受性腸炎ビブリオ (MMabd ($\Delta nhaA$, $\Delta nhaB$, $\Delta nhaD$, $\Delta nqrABCDEF$)) を作成することにより、ある程度細胞内 Na⁺ 濃度を高めることを可能とした。そこでこの株を用いて高濃度 Na⁺ 条件および低濃度 Na⁺ 条件に曝露した MMabd 株から mRNA を調製し、次世代シーケンサーによる Whole transcriptome 解析を行った。

Glycine、Betaine、Choline、Diaminobutylate、proline、ectoine などの生合成または輸送に関する遺伝子の多くの発現が上昇していた。しかし、これらの遺伝子はコントロールとして用いた AQ3334 株でも同様に上昇しており、Na⁺ 特異的に発現が上昇したわけではないと考えられた。また、DUF2383 domain-containing protein (VPUCM_0083)、RND-type drug efflux pump (VPUCM_2037-2039)、putative multidrug efflux pump (VPUCM_0909) などは、AQ3334 では発現上昇が見られず、MMabd においてのみ特に顕著に発現上昇していた。

細胞内 Na⁺ 濃度の変化によって発現変化が起こらないものが Na⁺ 感受性タンパク質であった場合、上記の方法で同定することは困難である。そこで、Na⁺ 感受性の MMabd 株から、Na⁺ による生育阻害を受けなくなった非感受性変異株 (耐性変異株) を得る実験を進めた。

その結果、5 株の Na⁺ 耐性変異株を得ることができた。これら 5 株はいずれも NaCl だけでなく LiCl にも耐性となっていたが、KCl に対する耐性度は MMabd 株と同等であった。また、耐塩性食中毒細菌である黄色ブドウ球菌では、すでに見出していた Mnh Na⁺/H⁺ アンチポーターの遺伝子破壊株の構築を進め、有望な候補株を得た。現在詳細な解析を進めている。

1. 研究目的

食品の保存において、塩の添加は重要である。塩、特に Na⁺ は細菌の増殖・生存に必須であるが、過剰の Na⁺ は生育阻害を引き起こす。しかし、なぜ Na⁺ によって生育阻害が起こるのかはよく分かっていない。塩は優れた保存剤であるが、Na⁺ による生育阻害作用が他の物質で代替でき

るのであれば、減塩食品の保存剤の開発につなげることが可能となる。

Na⁺ はイオンである。したがってそれ以上分解されないため、細菌が Na⁺ に対して抵抗する術、すなわち Na⁺ による生育阻害の回避には、細胞内に過剰に蓄積した Na⁺ を細胞外へ排出するメカニズムが重要となる。Na⁺ を細胞外

に排出するシステムはいくつか存在するが、生物界で最も広く知られているのが、 Na^+/H^+ アンチポーターである。 Na^+/H^+ アンチポーターは、細胞膜において Na^+ と H^+ を交換輸送するタンパク質である。そこで我々は耐塩性食中毒菌である黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、そして好塩性食中毒菌である腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*)を用いて、これまでに主要な Na^+ 排出系を同定してきた⁽¹⁻⁵⁾。そして最近腸炎ビブリオではこれらの Na^+ 排出系を欠損した株では、 Na^+ に対する感受性が増大し、細胞内 Na^+ 濃度が親株よりも顕著に上昇していることを突きとめた (Fig. 1)。このことから細胞内 Na^+ 濃度の上昇が直接の生育阻害の引き金になることが強く示唆された。

一方で、 Na^+ がなぜ生育阻害を起こすのかについては現在まで報告がない。 Na^+ はいくつかの細菌において、基質の取り込みや不要物質の排出など、物質の能動輸送におけるエネルギー (Na^+ -motive force と呼ばれる)を生み出すために重要なイオンである。特に腸炎ビブリオが属するビブリオ属細菌では、アミノ酸の輸送など多くの二次性能動輸送が Na^+ との共役輸送で行われていることが示唆されている⁽⁶⁻⁸⁾。しかし Na^+ 感受性を示す腸炎ビブリオ株においても細胞内よりも細胞外の Na^+ 濃度が高いため、ある程度の濃度勾配は形成されていると予想される。このことから単純にエネルギー (Na^+ -motive force)の低下によってのみ Na^+ 感受性が起こっているわけではないと推察された。

そこで我々はこれらの解析結果を利用し、細胞内 Na^+ の上昇によってどのような遺伝子発現変化が起き、そして機能が直接阻害されるタンパク質 (Na^+ 感受性タンパク質)が何かを同定する研究を行うこととした。最終的には、 Na^+ が細菌細胞の中で関わっている機能の全体像を明らかにすることで、保存剤が標的にできる因子を同定し、塩に頼らない保存剤の開発を目指す。

2. 研究方法

2.1 Suppression subtractive hybridization 法 (SSH 法, Fig. 2)

V. parahaemolyticus Mmabd (AQ3334, *DnhaA*, *DnhaB*, *DnhaD*, *DnqrABCDEF*)を、 NaCl 濃度を下げ KCl で浸透圧を補正した LB 培地 (1 % polypeptone, 0.5 % yeast extract, 50 mM NaCl , 120 mM KCl)で、37°C好気的に

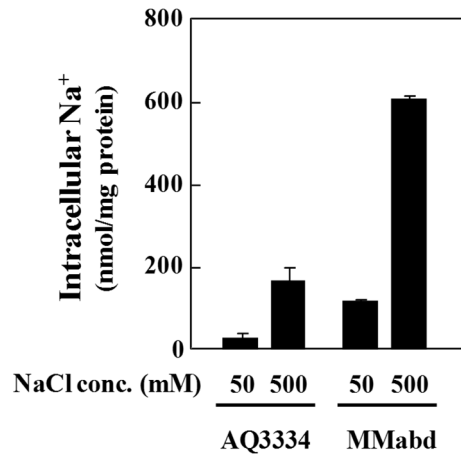


Fig. 1. Intracellular Na^+ concentration in *V. parahaemolyticus*. AQ3334 : wild-type. MMabd : *DnhaA*, *DnhaB*, *DnhaD*, *DnqrABCDEF*

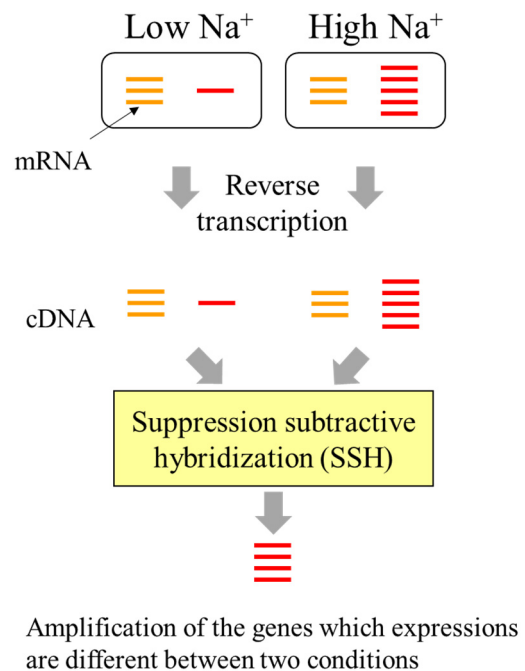


Fig. 2. Strategy of SSH

O.D.₆₅₀=0.7 まで振とう培養した。培養した菌液を集菌し、最少塩培地である Medium S (100 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 25 mM MgSO_4 , 10 mM KCl , 1 mM CaCl_2 , 0.01 mM FeSO_4 , 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.33 mM K_2HPO_4 , 0.5 % polypeptone 50 mM NaCl) で洗浄し、低濃度 Na^+ 条件では 50 mM NaCl 、高濃度 Na^+ 条件では 500 mM NaCl を含む Medium S に再懸濁し、30 分間曝露させた。その後、

RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.)により total RNA を抽出後、Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Z7401N)を用いて、添付プロトールに従って実験を進め、クローニングを行った。

2. 2 Whole transcriptome 解析による遺伝子発現解析

V. parahaemolyticus AQ3334 および MMabd を低濃度 Na⁺ 条件および高濃度 Na⁺ 条件 (方法 2. 1) で 30 分曝露し、その後 RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.) により total RNA を抽出した。次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析には、mRNA 以外の RNA (ほとんどは ribosomal RNA) が混在することで不都合を生じる。そこで、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (MRZGN126) (AR BROWN) を用いて、mRNA のみを抽出した。これらのサンプルを山口大学遺伝子実験施設に送付し、SOLiD5500 を用いたフラグメント解析を依頼した。得られたデータを解析ソフトウェア LifeScope (Life Technologies) により、リファレンス配列へのマッピングおよびタグカウントを行った。リファレンス配列としては *V. parahaemolyticus* UCM-V493 の配列を用いた⁹⁾。

2. 3 Na⁺耐性変異株の単離

Na⁺感受性を示す MMabd 株が生育できない 50 mM NaCl を含む Medium S 寒天培地に、MMabd 株の培養液を塗布し、耐性変異株を得た。得られた変異株について、NaCl、KCl、LiCl の最小生育阻止濃度 (MIC) を微量液体希釈法により測定した。

2. 4 黄色ブドウ球菌の Mnh 破壊株の構築

温度感受性複製起点およびテトラサイクリン耐性遺伝子を持つ、黄色ブドウ球菌遺伝子破壊用プラスミド pYT3 を用いて、黄色ブドウ球菌の多サブユニット型 Na⁺/H⁺ アンチポーターである Mnh を破壊した。

S. aureus N315 の染色体 DNA を鋳型とし、*mnh* 遺伝子群の前後約 1.6 kb の DNA 断片を PCR 法により増幅した。これら両者を pYT3 に組み込み、遺伝子破壊用プラスミド pYT3/MNHdel を構築した (Fig. 3)。

このプラスミドを Electroporation 法により *S. aureus* RN4220 に導入した。本プラスミドは 30°C の許容温度では *S. aureus* 内で複製できるが、非許容温度である 42°C では複製できない。30°C において細胞内にプラスミドを保持している株 (テトラサイクリン耐性を示す株) を選択した後、非許容温度にて培養を行った。非許容温度においてテトラサイクリン耐性になるためには、*mnh* 遺伝子群前後の相同領域において、プラスミド-染色体 DNA 間で組換えが起こる必要がある。こうして得られた株をさらに培養し、テトラサイクリン感受性となった株を選択する。テトラサイクリン感受性となるには、2 回目の相同組換えが起こる必要があり、原理上、テトラサイクリン感受性を示した株の半数は *mnh* 遺伝子群が破壊された株である。これら候補株の染色体 DNA を抽出し、PCR 法にて遺伝子破壊が行われた株を選択した。

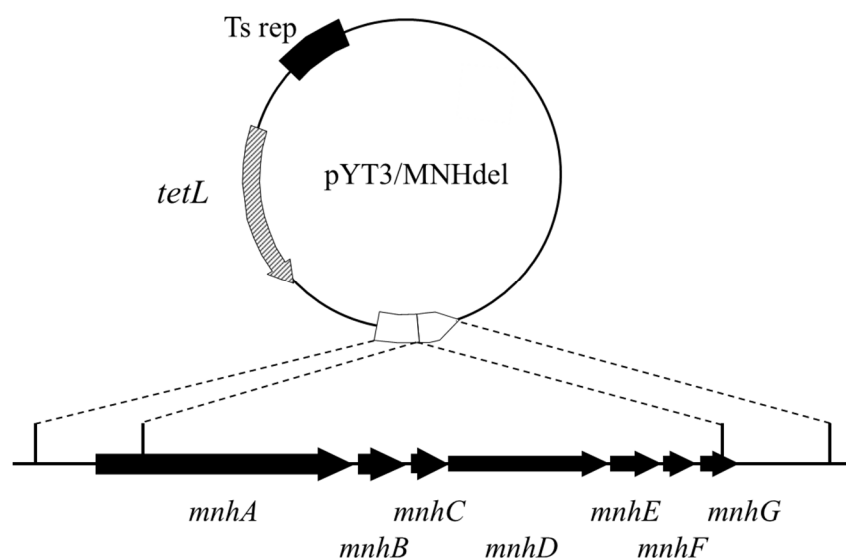


Fig. 3. Plasmid map of pYT3/MNHdel. Ts rep: temperature sensitive replication origin, tetL: tetracycline resistant gene

3. 研究結果

3. 1 Na⁺感受性タンパク質の同定

Na⁺感受性タンパク質を同定することができれば、そのタンパク質の機能阻害を引き起こすことができる Na⁺以外の物質も探索できるようになる。そこでまずは最もアプローチしやすい腸炎ビブリオを題材に Na⁺感受性タンパク質を同定することを目指した。

3. 1. 1 細胞内 Na⁺の上昇により発現が変化する因子の同定

細胞内 Na⁺の上昇により発現が変化する遺伝子は、Na⁺による機能障害を受ける可能性が高い。本来、細胞内 Na⁺濃度は上述した Na⁺/H⁺アンチポーターや呼吸鎖 Na⁺ポンプなどの調節システムにより一定に保たれており、生きたままの状態では細胞内 Na⁺濃度を自由に变化させることは極めて難しい。しかしこれまでに我々は Na⁺感受性腸炎ビブリオ (MMabd) を作成することにより、ある程度細胞内 Na⁺濃度を高めることを可能とした。そこでこの株において Na⁺濃度を变化させたときに発現変化する遺伝子を Suppression subtractive hybridization 法 (SSH 法) によりクローニングすることを目指した。

ここで注目しなければならないことは、細胞内 Na⁺濃度を上昇させすぎると、菌が死滅することである。細菌に限らずすべての細胞は一定のストレス環境下では、様々な遺伝子の発現が変化する。その中で Na⁺の濃度変化による遺伝子だけを選択するためには、細胞内 Na⁺濃度は上昇するが、生菌数ができるだけ変化しない条件である必要がある。種々の条件検討の結果、低濃度 Na⁺条件として 50 mM NaCl、高濃度 Na⁺条件では 500 mM NaCl を含む Medium S にし、30 分間曝露させることとした。

また SSH 法を行う上で計画当初から予想された問題点は、細菌細胞においては効率よく mRNA とその他の RNA (rRNA や tRNA) を分離する方法がないということであった。この点については、ある程度の rRNA を市販のキットで取り除いたのち、SSH 法の反応溶液中に、rRNA 遺伝子の DNA 領域を混ぜておくことで、解決することとした。

これらの点について種々検討を行ったが、遺伝子クローニングは成功しなかった。

3. 1. 2 Whole transcriptome 解析による遺伝子発現解析

SSH 法を用いた遺伝子クローニングが成功しなかった

ので、直接 mRNA の発現量の変化を評価することとした。発現変化を評価する方法はいくつかあるが、網羅的な解析ができるという点で、次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析を行うこととした。

山口大学での Whole transcriptome 解析では、4つの異なる条件で調製した mRNA についてその発現量を比較することができる。そこで、Na⁺感受性株である MMabd とその野生株である AQ3334 の 2 株を、高濃度 Na⁺条件と低濃度 Na⁺条件の溶液に曝露し、total RNA を抽出した。また、解析の妨げとなる rRNA の除去については、Ribo-zero rRNA removal kit (Invitrogen) により行った。

Whole transcriptome の結果を Table 1, 2 に示す。高濃度 Na⁺条件下で発現が上昇しているものとして、Glycine、Betaine、Choline、Diaminobutylate、proline、ectoine などの生合成または輸送に関係する遺伝子が挙げられる (VPUCM_20563-20568, VPUCM_1800-1803, VPUCM_1807-1809)。これらの遺伝子は隣接して存在することからオペロンを形成していると予想される。同属の *Vibrio cholerae* において、上記の分子は osmotic stress に対して compatible solute として知られているもの、またはその中間代謝産物であり、いくつかの遺伝子は osmotic stress に重要であることが報告されている^(10, 11)。これらの遺伝子の発現は AQ3334 でも MMabd でも顕著に増大しているため、Na⁺耐性に関係するというよりはむしろ osmotic stress に関係するものと考えられる。

AQ3334 では発現上昇が見られず、MMabd においてのみ発現上昇するものも見出された。DUF2383 domain-containing protein (VPUCM_0083) はアミノ酸配列からは Ferritin-like superfamily に属すると予想される。しかし、機能未知のタンパク質とされており、また Blast search を行ったが、他の種属においては類似性の高いタンパク質は見いだされなかった。VPUCM_2037-2039 は VmeGHI と我々が名付けたものであり、塩化ベンザルコニウムなどの消毒薬や胆汁酸塩 (デオキシコール酸, グリココール酸, タウロコール酸) を細胞外に排出する RND 型 (Resistance Nodulation cell Division) 多剤排出ポンプである⁽¹²⁾。これまでの解析では、Na⁺耐性に関するデータは得られていない。

VPUCM_0909 は多剤排出ポンプと予想されているものである。この遺伝子は、両株において高濃度 Na⁺条件下

で発現が上昇していた。我々はこれまでに、Na⁺/H⁺アンチポーター三重破壊株 XACabd (*DnhaA*, *DnhaB*, *DnhaD*) からトランスポゾン挿入変異株ライブラリーを構築し、Na⁺感受性となった株をいくつか得ている (投稿準備中)。その中の一つに VPUCM_0909 にトランスポゾンが挿入されているものがあった。このタンパク質の機能はまだ明らかにしていないが、今後特に注目して解析を進めたい。

一方で、高濃度 Na⁺条件下で発現が低下したのものも見

られる。発現上昇したのものとは異なり、AQ3334 と MMabd で共通のものはほとんど見られなかった。AQ3334 では、*N*-acetylneuraminate や C4-dicarboxylate の輸送に関係すると考えられる遺伝子が、MMabd では、glycerol の輸送に関すると考えられる遺伝子などの発現が減少していた。これらの遺伝子の発現低下から特定の細胞内環境の変化は現時点では類推できない。さらに慎重に情報収集を行う必要がある。

Table 1. Genes whose expression was different between two conditions (AQ3334)

VP number	Low Na ⁺ (RPKM)	High Na ⁺ (RPKM)	Ratio (High/Low)	Description
VPUCM_1313	3.27	249.5	76.3	High-affinity choline uptake protein BetT
VPUCM_20566	4.35	224.03	51.5	L-proline glycine betaine binding ABC transporter protein ProX
VPUCM_20565	3.75	182.57	48.7	Choline dehydrogenase
VPUCM_20563	5.86	266.02	45.4	HTH-type transcriptional regulator BetI
VPUCM_1803	5.74	246.07	42.9	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase
VPUCM_20564	6.72	270.73	40.3	Betaine aldehyde dehydrogenase
VPUCM_1587	3.88	153.82	40.0	Choline-glycine betaine transporter
VPUCM_1802	8.74	264.89	30.3	Diaminobutyrate pyruvate aminotransferase
VPUCM_1809	3.22	86.96	27.0	L-proline glycine betaine binding ABC transporter protein ProX
VPUCM_1808	2.18	50.6	23.2	L-proline glycine betaine ABC transport system permease protein ProW
●				
●				
●				
VPUCM_1278	485.21	75.02	0.155	Carboxynorspermidine decarboxylase
VPUCM_20275	260.89	33.35	0.128	Heat shock protein 60 family chaperone GroEL
VPUCM_1277	1946.87	245.52	0.126	Carboxynorspermidine dehydrogenase
VPUCM_1276	1544.11	182.8	0.118	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase
VPUCM_1605	406.99	44.29	0.109	Putative formate dehydrogenase-specific chaperone
VPUCM_2464	151.43	16.46	0.109	membrane protein
VPUCM_0528	8993.3	838.45	0.093	Carbon starvation protein A
VPUCM_1604	458.36	41.99	0.092	Iron-sulfur cluster-binding protein
VPUCM_20467	499.28	43.53	0.087	Protein-export membrane protein SecD
VPUCM_20468	623.41	47.74	0.077	Protein-export membrane protein SecF

Table 2. Genes whose expression was different between two conditions (MMabd)

VP number	Low Na ⁺ (RPKM)	High Na ⁺ (RPKM)	Ratio (High/Low)	Description
VPUCM_20563	4.32	1311.32	303.5	HTH-type transcriptional regulator BetI
VPUCM_20565	3.35	851.49	254.2	Choline dehydrogenase
VPUCM_20564	7.12	1322.28	185.7	Betaine aldehyde dehydrogenase
VPUCM_1587	7.56	1056.53	139.8	Choline-glycine betaine transporter
VPUCM_20566	6.55	669.81	102.3	L-proline glycine betaine binding ABC transporter protein ProX
VPUCM_1313	9.98	427.08	42.8	High-affinity choline uptake protein BetT
VPUCM_20567	7.23	252.1	34.9	L-proline glycine betaine ABC transport system permease protein ProW
VPUCM_1803	2.59	76.03	29.4	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase
VPUCM_1802	2.82	62.42	22.1	Diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase
VPUCM_0077	9.7	198.63	20.5	putative hyperosmotically inducible periplasmic protein
VPUCM_0085	1.8	36.48	20.3	putative membrane protein
VPUCM_0083	4.8	67.05	14.0	DUF2383 domain-containing protein
	●			
	●			
	●			
VPUCM_1555	78.72	8.22	0.104	SM-20-related protein
VPUCM_20858	951.04	95.99	0.101	Permease of the major facilitator superfamily
VPUCM_21292	693.62	62.8	0.091	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS
VPUCM_0857	61.42	5.34	0.087	Glycerol-3-phosphate transporter
VPUCM_20163	1023.49	88.71	0.087	Multidrug resistance protein D
VPUCM_2987	311.34	24.74	0.080	Lysine decarboxylase, inducible
VPUCM_2948	87.72	5.24	0.060	membrane protein
VPUCM_20752	171.02	5.71	0.033	Formate efflux transporter
VPUCM_2988	522.95	16.18	0.031	Lysine/cadaverine antiporter membrane protein CadB

3. 1. 3 Na⁺耐性変異株の単離

上記3. 1及び3. 2の実験で、Na⁺感受性タンパク質が必ず同定できるとは限らない。標的とする遺伝子が細胞内 Na⁺濃度の変化によって発現変化が起これないものであった場合、上記の方法で同定することは困難である。そこで Na⁺感受性の MMabd から、Na⁺による生育阻害を受けなくなった非感受性変異株(耐性変異株)を得る実験を

並行して進めた。その結果、5株の Na⁺耐性変異株を得ることができた。これらについて NaCl の最小生育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) を測定した。NaCl と同時に Na⁺/H⁺アンチポーター遺伝子破壊によって感受性となった LiCl、AQ3334 と MMabd でほとんど耐性に変化がない KCl の MIC も測定した。その結果を **Table 3** に示す。得られたすべての株で、NaCl 及び LiCl の MIC

Table 3. MIC for NaCl, LiCl, KCl in *V. parahaemolyticus*

	MIC (mM)		
	NaCl	LiCl	KCl
AQ3334 (wild-type)	>800	100	800
MMabd (parent)	25	3	400
HPY01	800	400	400
HPY02	800	400	400
HPY03	800	400	800
HPY04	800	400	800
HPY05	800	200	800

が明らかに上昇しており、LiCl に関しては親株である AQ3334 以上であった。一方、KCl の MIC はほとんど変化しなかった。MMabd 株は Na⁺ (および Li⁺) 耐性に深く関わる遺伝子を破壊しており、これら遺伝子の過剰発現による耐性とは考えられない。MMabd では発現していなかった (発現抑制されていた) Na⁺ を排出できる輸送タンパク質が発現するようになったか、Na⁺ 感受性タンパク質が非感受性となるような変異が起こったかのどちらかであると考えられる。大腸菌においては解糖系の酵素である pyruvate kinase を Li⁺ が阻害することが報告されている⁽¹³⁾。腸炎ビブリオに対してはこのような報告はまだないが、一つの候補として注目すべきである。

3. 2 黄色ブドウ球菌の Mnh 破壊株の構築

腐敗が問題となる細菌は多種多様であるため、上記で用いた腸炎ビブリオにのみ特有である遺伝子では、本研究の目的の一つである普遍的な Na⁺ 感受性タンパク質を同定することが達成できない可能性もある。そこで耐塩性食中毒細菌である黄色ブドウ球菌も並行して使用することとした。しかしこれまでに黄色ブドウ球菌の耐塩性について詳細な解析はあまり行われていない。まずは Na⁺ 感受性の黄色ブドウ球菌の構築を行うこととした。

黄色ブドウ球菌にはこれまで解析が行われている大腸菌や腸炎ビブリオとはタイプの異なる Na⁺/H⁺ アンチポーターが存在している。これは Mnh システムと呼ばれるものであり、以前我々の研究室で見出したものである⁽²⁾。そこでこの遺伝子の破壊を行った。遺伝子破壊法には様々な方法があるが、病原細菌である黄色ブドウ球菌に薬剤耐性遺伝子を導入してその状態のまま使用するの、別の遺

伝子の破壊が難しくなる。そこで、薬剤耐性遺伝子を残さない方法を採用した。そのために温度感受性プラスミドを活用した。

その結果、2 株の有力な候補株が得られた。現在これらの株について解析を進めている。

4. 考 察

Transcriptome 解析では多種多様な遺伝子の発現変化が見られた。特に野生株である AQ3334 と Na⁺ 感受性株である MMabd で差が見られることは興味深い。しかし、すべての遺伝子が Na⁺ 濃度の上昇によって変化が起きたものではない。Glycine や Betaine などの osmoprotectant (浸透圧の上昇に対して細胞を守るために取り込まれる低分子) の生合成経路及び細胞内への取り込みを行う機能を持つタンパク質の遺伝子発現が上昇している。しかし、このことはある程度予想していたとおりであり、Na⁺ 特異的に発現上昇が起こったわけではないと考えている。その他にも両株で発現が上昇しているものはあるが、これらよりはむしろ MMabd 株だけで発現上昇しているものの解析を進めるべきであると考えている。上述した DUF2383 domain-containing protein (VPUCM_0083) や VPUCM_0909 はもちろんのこと、Na⁺ 感受性となったトランスポゾン挿入変異株に関連する可能性を見出している遺伝子のうち、MMabd 株でのみ発現変化が起こっていたものが3つ存在する。これらについても併せて解析を進めていくべきである。

残念ながら SSH 法によって発現変化のある遺伝子のクローニングはできなかった。現在のところその理由を検討

しているが、キットを使用していることから、すぐには解決できないと考えられた。

5. 今後の課題

Transcriptome 解析の結果については、発現変化があったものについて、他の細菌で明らかとなっている知見をさらに集める必要がある。細胞内 Na⁺濃度の上昇が細胞の死に向かうトリガーだとすると、さまざまなストレス応答が起きることも十分考えられる。また細胞が死滅しはじめたことによって発現が上昇するような遺伝子も存在するであろう。これらのものを適宜選択しながら候補遺伝子を絞り込んでいく。

腸炎ビブリオでの Na⁺耐性株、黄色ブドウ球菌での遺伝子破壊株は、有望な候補株を得ることはできた。今後、塩存在下での生育や、塩存在下での mRNA レベルの変化、Na⁺輸送活性、細胞内 Na⁺濃度の測定など、解析を進めていく。

6. 文献等

1. **Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T.** 2005. Physiological Roles of Three Na⁺/H⁺ Antiporters in the Halophilic Bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* **49**:711-719.
2. **Hiramatsu T, Kodama K, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T.** 1998. A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**:6642-6648.
3. **Kuroda T, Shimamoto T, Inaba K, Tsuda M, Tsuchiya T.** 1994. Properties and sequence of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **116**:1030-1038.
4. **Nozaki K, Inaba K, Kuroda T, Tsuda M, Tsuchiya T.** 1996. Cloning and sequencing of the gene for Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**:774-779.
5. **Nozaki K, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T.** 1998. A new Na⁺/H⁺ antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1369**:213-220.
6. **Tokuda H.** 1989. Respiratory Na⁺ pump and Na⁺-dependent energetics in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**:693-704.
7. **Tokuda H, Unemoto T.** 1981. A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochem Biophys Res Commun* **102**:265-271.
8. **Tokuda H, Unemoto T.** 1982. Characterization of the respiration-dependent Na⁺ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J Biol Chem* **257**:10007-10014.
9. **Kalburge SS, Polson SW, Boyd Crotty K, Katz L, Turnsek M, Tarr CL, Martinez-Urtaza J, Boyd EF.** 2014. Complete Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Environmental Strain UCM-V493. *Genome announcements* **2**:e00159-00114.
10. **Kapfhammer D, Karatan E, Pflughoeft KJ, Watnick PI.** 2005. Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**:3840-3847.
11. **Pflughoeft KJ, Kiersek K, Watnick PI.** 2003. Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl Environ Microbiol* **69**:5919-5927.
12. **Matsuo T, Nakamura K, Kodama T, Mikami T, Hiyoshi H, Tsuchiya T, Ogawa W, Kuroda T.** 2013. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiologyopen* **2**:725-742.
13. **Umeda K, Shiota S, Futai M, Tsuchiya T.** 1984. Inhibitory effect of Li⁺ on cell growth and pyruvate kinase activity of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**:812-814.

Basic Research for Development of Alternative Compounds to Preserve Low-Sodium Food

— Identification of Universal Factors Sensitive to Na⁺ —

Teruo KURODA

Graduate School of Medicine, Dentistry, Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Summary

Sodium (Na⁺) is important for food preservation. Na⁺ is essential for bacterial proliferation and survival, but excess amount of Na⁺ causes growth retardation or inhibition. However, mechanism of growth inhibition by Na⁺ is unknown. So, we tried to investigate transcriptomic analyses under high intracellular Na⁺ condition, and to identify proteins which is responsible for Na⁺ toxicity.

Since intracellular Na⁺ concentration is essentially maintained constant by some transporters, such as Na⁺/H⁺ antiporter(s) and respiratory Na⁺ pump (NADH-quinone oxidoreductase), it is difficult to change the concentration to desired level for living cell. Previously, we constructed Na⁺-sensitive *Vibrio parajaemolyticus* (MMabd), which all of *nhaA*, *nhaB*, *nhaD*, and *nqrABCDEF* were deleted. We have already shown that intracellular Na⁺ concentration in MMabd was significantly higher than that in wild-type strain AQ3334. It means we can increase intracellular Na⁺ concentration in MMabd. So, mRNA of MMabd exposed to higher Na⁺ concentration medium was prepared, and we performed whole transcriptomic analysis with next-generation sequencer.

Genes of enzymes and transporters for biosynthetic pathway of compatible solutes against osmotic stress such as glycine, betaine, choline, diaminobutylate, proline, and ectoine were highly expressed at higher Na⁺ condition. However, these genes didn't seem to be Na⁺ specific since these genes were expressed higher also in wild-type strain. DUF2383 domain-containing protein (VPUCM_0083), RND-type drug efflux pump (VPUCM_2037-2039), putative multidrug efflux pump (VPUCM_0909) were significantly higher expressed in MMabd, but not in AQ3334.

When expression level of our target proteins were not changed between low and high Na⁺ condition, it would be difficult to identify them with transcriptomic analysis. We so tried to isolate Na⁺-resistant mutants from MMabd. We obtained five mutants, and they showed higher minimum inhibitory concentrations (MIC) for NaCl and LiCl, but not KCl. In these mutants, it was expected that novel Na⁺ efflux transporters are expressed, and/or loss of Na⁺-sensitivity of target proteins are occurred.

We also tried to construct Mnh operon deleted strain in *Staphylococcus aureus*, which is a Na⁺/H⁺ antiporter. Now, we are investigating these mutants in detail.