

# 大腸菌およびStreptococcus属細菌のギ酸生成とその代謝機構

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者名	西村,順子 米山,裕 磯貝,恵美子 川井,泰 齋藤,忠夫
発行元	日本酪農科学会
巻/号	63巻1号
掲載ページ	p. 19-26
発行年月	2014年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



大腸菌および *Streptococcus* 属細菌のギ酸生成とその代謝機構西村順子<sup>1\*</sup>・米山 裕<sup>1</sup>・磯貝恵美子<sup>1</sup>・川井 泰<sup>2</sup>・齋藤忠夫<sup>1</sup><sup>1</sup>東北大学大学院農学研究科, 仙台市, 981-8555)<sup>2</sup>日本大学生物資源科学部, 神奈川県藤沢市, 252-0880)Formic acid production and its metabolic mechanism on *Escherichia coli* and genus *Streptococcus*Junko Nishimura<sup>1\*</sup>, Hiroshi Yoneyama<sup>1</sup>, Emiko Isogai<sup>1</sup>, Yasushi Kawai<sup>2</sup>, and Tadao Saito<sup>1</sup><sup>1</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 981-8555)<sup>2</sup>College of Bioresource Science, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252-0880)

## はじめに

ヨーグルトは、通常 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* という2種類の乳酸菌による共培養により製造されている。WHO/FAOのコーデックス委員会では、国際規格として「ヨーグルトは *L. bulgaricus* および *S. thermophilus* の両菌の乳酸発酵作用により乳及び脱脂粉乳などの乳製品から作られるもの」と規定している。この2菌種を同時に乳発酵に用いるのには、大きな理由がある。すなわち、乳中でこれら2菌種による「共生関係」が構築されており、初めに生育の早い *S. thermophilus* がギ酸、ピルビン酸、葉酸<sup>1)</sup>、二酸化炭素<sup>2)</sup>を *L. bulgaricus* に供給し、その後生育の遅い *L. bulgaricus* が菌体外プロテアーゼやペプチダーゼを生産し、乳中のカゼインやホエータンパク質から生成したペプチドやアミノ酸を *S. thermophilus* が利用してさらなる生育を促進している<sup>3)</sup>。

*S. thermophilus* から *L. bulgaricus* へ供給される「ギ酸」は、*L. bulgaricus* は自ら合成することができない生育に必須な物質であるため、環境からのギ酸供給が不足すると *L. bulgaricus* の生育制限が生じる<sup>3)</sup>。つまり、*S. thermophilus* からのギ酸生成機序の知見を深めることは、今後の発酵乳製造の展開を考える上で、非常に重要となると考えられる。Suzukiらは、ギ酸は *L. bulgaricus* の *de novo* プリン合成に利用され<sup>4)</sup>、ギ酸不足によって菌体の異常伸長が生じることを報告している<sup>5)</sup>。

近年筆者らは、ギ酸が *L. bulgaricus* の細胞表層構造を正常化させることで、細胞分割の正常化が起こり細胞増殖の活性化に大きく寄与することを明らかにした<sup>6)</sup>。

本稿では、細菌のギ酸生成とその代謝機構について、モデル生物の一つである大腸菌 (*Escherichia coli*) および *Streptococcus* 属の研究を紹介し、*S. thermophilus* のギ酸代謝を理解することにより、ヨーグルト製品への応用をはじめ今後の発酵乳製造の将来性や展望について考えていきたい。

1. *E. coli* におけるギ酸生成と代謝機構

*E. coli* は糖代謝で中間代謝物としてギ酸を生成し、最終産物として二酸化炭素と水素を生成する<sup>7-9)</sup> (Fig. 1)。ギ酸を生成する前段階の糖代謝中間産物であるピルビン酸は、好気条件下(破線の枠内)ではピルビン酸デヒドロゲナーゼ(Pyruvate dehydrogenase: PDH)によりアセチル CoA と二酸化炭素に分解され、TCA 回路に入る。一方、嫌気条件下(実線の枠内)では、ピルビン酸ギ酸リアーゼ(Pyruvate formate-lyase: PFL)によりギ酸が生成して、さらにはギ酸水素リアーゼ(Formate hydrogen-lyase: FHL)により最終的に二酸化炭素と水素が生成する<sup>10)</sup>。この最終段階で働く FHL は、ギ酸デヒドロゲナーゼ H (Formate dehydrogenase-H: FDH<sub>H</sub>) とヒドロゲナーゼ 3 (Hydrogenase-3: Hyd-3) から形成される複合体 (FDH<sub>H</sub>/Hyd-3) である。FHL 複合体を構成する酵素の一つのギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) は、その触媒作用によってギ酸から二酸化炭素を生成させるが、触媒分子の種類によって3種 (FDH<sub>O,N,H</sub>) に区分されている。なかでも FDH<sub>H</sub> は、*E. coli* 由来水素ガスをバイオマスとして活用しようとする観点からも近年注目されている。FHL を形成している他方の酵素、ヒドロゲナーゼについては、*E. coli* で4種 (Hydro-

\* 連絡者 西村順子 (にしむら じゅんこ)  
〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1  
東北大学大学院農学研究科・農学部 技術部  
(Tel & Fax : 022-717-8947,  
E-mail : juemura@bios.tohoku.ac.jp)  
2013年10月16日 受付  
2014年1月9日 受理

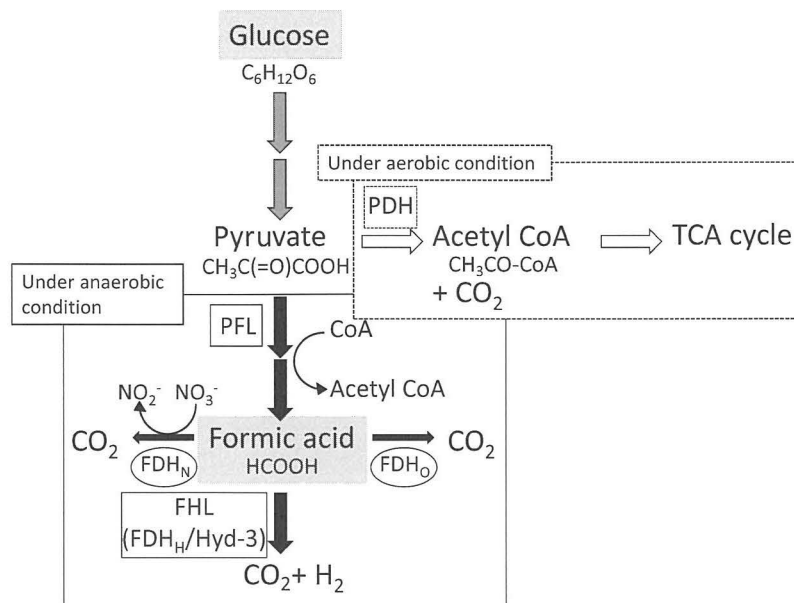


Fig. 1 Aerobic and anaerobic glucose metabolism in *Escherichia coli*.

PDH: Pyruvate dehydrogenase, PFL: Pyruvate formate-lyase, FHL: Formate hydrogenlyase, FDH: Formate dehydrogenase, Hyd-3: Hydrogenase-3. [Cited from Ref. 8 and 9 with modification]

genase-1, 2, 3, 4) が報告されており, FHL 複合体形成の研究から, とくに Hyd-3 に関する研究が進んでいる<sup>11,12)</sup>. 近年, FhlA (転写調節タンパク質) が Hyd-3 と FDH<sub>H</sub> の遺伝子発現を活性化することが報告された<sup>15)</sup>.

ギ酸代謝による水素分子の生成機構を Fig. 2 に示した. FDH<sub>H</sub> と共に作用する Hyd-3 の構造遺伝子は, 「*hyc* オペロン」にコードされている 8 つの遺伝子 (*hyc* B, C, D, E, F, G, H, I) からなるクラスターを形成している<sup>12)</sup>. 細胞膜における FHL 複合体 (破線の枠内) は, FDH<sub>H</sub> と 6 つのポリペプチド (HycB, C, D, E, F, G, 灰色) から構成され, FDH<sub>H</sub> と HycE は細胞膜の内側に存在し, その他の 5 種は細胞膜内もしくは細胞膜を貫通して存在すると考えられている. ギ酸の電離で生じた電子 ( $2e^-$ ) は FDH<sub>H</sub> を経由して HycB→HycF→HycG→HycE の順に電子が受け渡され, 2 分子の水素イオン ( $2H^+$ ) に電子が供与されて, 最終的に水素分子 ( $H_2$ ) が生成する. この一連の電子の流れは, HycB と HycF の Fe-S (鉄-硫黄) クラスター<sup>13)</sup>ならびに HycE の Ni-Fe (ニッケル-鉄) ヒドロゲナーゼ<sup>14)</sup>の金属イオンの作用で行われる. また, *hyc* オペロンの残り 2 つの HycH と HycI は, いずれも Hyd-3 ユニット前駆体が活性型になるとときに必要なタンパク質で, FHL 複合体構成には直接的に関与していない. なお, HycC, D の 2 つのタンパク質は, FHL 複合体を構成するサブユニットであるが, いずれも機能については解明されていない.

*E. coli* の細胞内で生成したギ酸は解離すると同時に水素イオンも蓄積する. これらは FHL 複合体で水素分

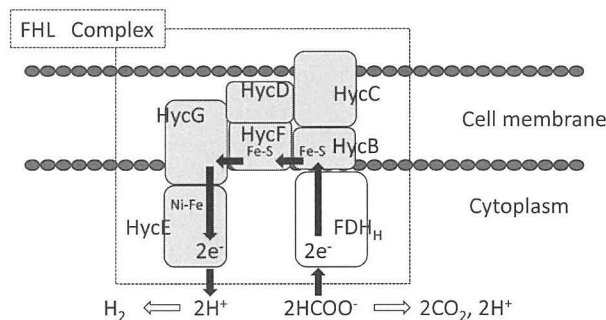


Fig. 2 Putative model of formate hydrogenlyase (FHL) complex and proton translocation in the cell membrane of *Escherichia coli*.

FHL complex is surrounded with dotted line. FHL complex is consisted with formate-dehydrogenase H (FDH<sub>H</sub>) and six polypeptides (Hyd-3: overlaid with gray). The electrons are transferred as indicated in black arrows and hydrogen gas and carbon dioxide are produced from formate. [Cited from Ref. 12 and 13 with modification]

子に変換されるが, 過剰のギ酸イオンおよび水素イオンは, 細胞内 pH のホメオスタシス (恒常性) 維持のため, 細胞外へ排出しなければならない. ギ酸の細胞外輸送には, トランスポーター FocA が関与している<sup>16)</sup>. このトランスポーターはアクアポリン (水チャネル) に類似しており, 5 量体の個々のプロトマーの N-末端ヘリックス領域と C-末端領域ならびに  $\Omega$  ループといわれる部位の構造を pH 依存的に変化させ, pH 7.0 ではこのチャネルが開いて基質 (ギ酸) が通過できるが, pH 5.1 ではチャネルが閉鎖すると報告されている<sup>17)</sup>. また FocA を

經由する以外の別経路として、トランスポーター FocB の存在も示唆されている<sup>18)</sup>。

*E. coli* はモデル生物としてだけでなく、その発酵特性を生かした工業的活用が検討されている。前述した *E. coli* 由来水素ガス生産は、糖源と細胞外 pH に影響されるのが判明しており<sup>9,20,21)</sup>、糖源をグルコースより安価なグリセロールに変えるなどの研究が進展している。

## 2. *S. mutans* の糖代謝とギ酸生成

*Streptococcus* 属は乳酸菌の中で、*Lactobacillus* 属に次いで二番目に多い菌種から構成される属である。*Streptococcus* 属細菌は、人や動物の口腔や消化管から分離され、病原性を有するものが多いが、唯一 *S. thermophilus* だけが有用微生物として発酵乳製造に利用されている。

ここでは、研究の進んでいる *S. mutans* を例として説明する。*S. mutans* はグラム陽性の通性嫌気性細菌であり、主要な「う蝕（虫歯）」原因菌の一種である。糖代謝から生じた乳酸などの有機酸でエナメル層が脱灰され、う蝕が生じる<sup>22,23)</sup>。Fig. 3 には *S. mutans* の糖代謝の概略を示した。*S. mutans* は細胞内に糖（グルコース）を PTS 系で取り込み、エムデンマイヤーホフ（EM）経路を介してピルビン酸に変換し、好気性条件下（破線）では乳酸脱水素酵素（Lactate dehydrogenase: LDH）

の作用により乳酸を生成するが、嫌気的条件下（実線）下では PFL の作用によりギ酸を生成する<sup>24)</sup>。*S. mutans* も前述の *E. coli* と同様に、ギ酸を FDH-Hyd 複合体の FHL で分解し、水素分子と二酸化炭素を生成する。糖の種類や供与量によって主となる発酵経路に差が生じるのも、*E. coli* 同様である。嫌気条件下で、資化しやすい糖源が高含量のときは LDH による乳酸生成が優勢となるが、糖含量が低く、あるいは資化性の低い糖を利用するときには PFL による代謝が主流となり、ギ酸、エタノール、酢酸、二酸化炭素の生成割合が増加する<sup>25)</sup>。また、糖代謝中間体であるフルクトース 1,6-二リン酸が高濃度になると PFL 阻害が生じ、糖の供与過剰状態では PFL の生成自体が抑えられる<sup>26)</sup>。*S. mutans* の糖代謝も、酸素の存在の有無や糖源によって代謝経路が大きく異なり、糖代謝によるエネルギー獲得や酸生産能は複雑にコントロールされているので、これらの制御により目的成分を増産させることも可能と考えられる。

## 3. PFL と PFL 活性化酵素 (PFL Activase)

*E. coli* (Fig. 1) や *S. mutans* (Fig. 3) の嫌気的な糖代謝において重要な PFL は、酸素感受性が非常に高く、酸素に接触すると瞬時に失活する酵素である。これは酸素と PFL の活性中心のラジカル反応で生じた活性酸素により、PFL のポリペプチド鎖が切断されるため

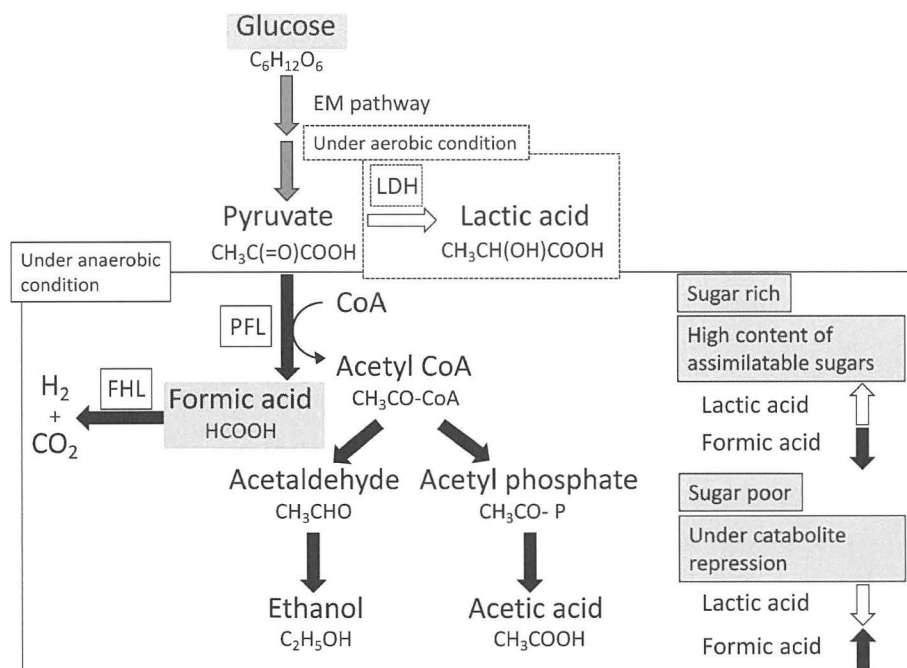


Fig. 3 Aerobic and anaerobic glucose metabolism in *Streptococcus mutans*. EM pathway: Embden-Meyerhof pathway, LDH: Lactate dehydrogenase, PFL: Pyruvate formate-lyase, FHL: Formate hydrogenlyase. [Cited from Ref. 25 with modification]

である<sup>27)</sup>。しかし嫌気状態の一定条件下でPFL Activaseの作用によって再活性化し<sup>28~30)</sup>、その反応にはS-アデノシルメチオニンやFe<sup>2+</sup>、還元物質(NADPH)などが関与している<sup>30,31)</sup>。*Streptococcus*属細菌に見出されているPFLは菌種によって酸素感受性および型転換が異なり、*S. mutans*のPFLは*S. sanguis*のPFLよりも酸素傷害を受けやすいが、好気条件下でも僅かに発現している<sup>25,29)</sup>。*Streptococcus*属細菌のPFL発現特性は、生育時期や生息場所、さらには進化過程の関連性が示唆されている<sup>25,29)</sup>。

*S. mutans*のPFLの生合成遺伝子は染色体上に*pfl*としてコードされており、総塩基数は2,325 bp, ORFからアミノ酸残基数は775、分子量は87,533のタンパク質で、推定アミノ酸配列は*E. coli*の*pfl*遺伝子と類似性が非常に高い<sup>32,33)</sup>。PFL Activase 遺伝子(*act*)は、*pfl*から離れた領域に存在が確認されている<sup>34)</sup>。*act*は他の菌種(*Lactococcus lactis*, *S. bovis*, *E. coli*)でも報告されているが<sup>25)</sup>、*E. coli*の*act*は*pfl*直近の下流領域に存在しており、*S. mutans*のPFL発現調節は*E. coli*と異なるようである。両菌のPFLの至適pHは、*S. mutans*はpH 6.8(中性域)であるのに対し、*E. coli*ではpH 7.6-7.7(塩基性域)であり、*S. mutans*のほうがPFLをより活性化しやすい状態といえる<sup>35~37)</sup>。

*S. mutans*では*act*の存在が確認されているものの、タンパク質としての検証例はない。タンパク質としてのPFL Activaseが確認されているのは、*E. coli*のみである<sup>36,38~40)</sup>。*E. coli*のPFL ActivaseはS-アデノシルメチオニン、Fe<sup>2+</sup>、還元型フラビン、DTT、ピルビン酸による触媒作用でPFLが活性型となる一方、PFLを不活性化させるシステムもあり、この反応にはFe<sup>2+</sup>の他にNADやCoA、ピルビン酸が作用している<sup>40,41)</sup>(ピルビン酸は正負両方のエフェクターとなる)。またFe<sup>2+</sup>以外の2価金属イオン(Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>)も阻害的に作用すると考えられている<sup>36)</sup>。

#### 4. *S. thermophilus* のPFL

現在のところ、*S. thermophilus*のギ酸およびPFLに関しての直接的な論文は1報のみである。2005年、Derzelleらは、*S. thermophilus*を合成培地(M17-Lac)と乳培地でのプロテオーム特性を比較することによって*S. thermophilus*の乳に対する適応性を報告した<sup>42)</sup>。その結果、*S. thermophilus*を乳中で生育させると、窒素代謝および糖代謝の両方で大きな変化がみられ、とくに*pfl*の発現が顕著に増加し、PFLの著しいアップレギュレーションが確認できた。またギ酸やプリンスクレオチドの欠乏状態でも、同様の現象が生じた。彼らは*S. thermophilus* PFLの発現が翻訳レベルで制御されてお

り、翻訳後の活性化を推測している。また、PFL活性化因子の*act*は、*S. mutans*同様、*pfl*直近領域には存在しておらず、*pfl*の上流域にはカタボライト抑制に関与するcis配列(cre box)が認められたことから、酸素だけでなく糖のカタボライト抑制の影響も受ける可能性を指摘している。さらに、乳培地での*pfl*の発現が増強されているのに培地中のギ酸は増加せず、*S. thermophilus*自身の生育に利用されたのではないかと考察している。なお、*S. thermophilus*が絶対嫌気条件下にはおかれていない通常の乳培地で良好に生育し、しかも培養開始直後から*pfl*の発現が誘導される理由は不明である。乳には特別な活性酸素除去物質が存在しているのかもしれない。

筆者らは*S. thermophilus*のPFLについてBLAST解析を行ったところ、これまでに6菌株(LMG18311, CNRZ1066, LMD-9, ND03, JIM8232, MN-ZLW-002)のPFL配列が決定されており、そのアライメント解析ではいずれも769残基におけるアミノ酸一致率は99~100%と極めて保存性が高いことが判った。同時に、*Streptococcus*属細菌間のPFLの相同性について、*S. mutans* GS-5と*S. thermophilus* LMG18311のPFLのアライメントも行った(Fig. 4)。*S. mutans*のアミノ酸残基数は775残基と*S. thermophilus*の6菌株と比較して6残基少なく、両タンパク質のアミノ酸レベルでの相同性も89%と低かった。また、両菌種のPFLはいずれも親水性タンパク質であり、平均疎水性値はそれぞれ-0.3854, -0.4298と、*S. thermophilus* PFLの方が、少し親水性が高かった(SOSUIの結果より)。両菌種のPFLの触媒部位ならびにラジカル形成部位は、それぞれ(409) SCISCCVSPL (418) および (734) RISGYCV (740) と完全一致し、活性部位は完全に保存されていた。なお本活性部位は*S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. equi*のPFLとも一致したが、*E. coli*のPFLの活性部位配列パターンとは大きく異なっていた<sup>43)</sup>。これらの結果より、PFL活性発現に関しては同属内での高度保存が示唆され、大変興味深い点である。

#### 最後に

筆者らはこれまで*L. bulgaricus*が生産する機能性菌体外多糖の生産性機構<sup>6,44~46)</sup>に着目して研究を遂行してきた。ヨーグルト中の菌体外多糖生産性の向上には、共生する*S. thermophilus*の生育性や発酵特性が重要であり、*S. thermophilus*のギ酸生成能は主要因の一つである<sup>47)</sup>。つまり、*S. thermophilus*のギ酸生成促進能の高い菌株の選択利用は、ヨーグルト製造における品質を大きく左右することに繋がる。*S. thermophilus*のPFLが効果的に発現する環境は、発酵乳製造の時間短縮による

<i>S. mutans</i> GS-5		MATVKTNTDVFKEAWEGFKGTDWKDRASISRFVQDNYTPYDGDDESFLAGPTERSLHIKKV	60
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	1	MATVKTNTDVFKEAWEGFKGTDWK++AS+SRFVQ NYTPYDGDDESFLAGPTERSL IKK+	60
<i>S. mutans</i> GS-5	61	VEETKAHYEETRFPMDTRITSIADIPAGYIDKENELIFGIQNDLFLKLNFMKGGIRMAE	120
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	61	VEETKAHYEETRFPMDTR TSIADIPAGYI K++ELI+GIQNDLFLKLNFMKGGIRMAE	120
<i>S. mutans</i> GS-5	121	TALKEHGYEPDPAVHEIFTKYATTVNDGIFRAYTSNIRRARAHAHTVTGLPDAYSRGRIIG	180
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	121	TALKEHGYEPDPAVHEIFTK+ TTVNDGIFRAYTSNIRRARAHAHT+TGLPDAYSRGRIIG	180
<i>S. mutans</i> GS-5	181	VYARLALYGADYLMQEKVNDWNSIAEIDEESIRLREEINLQYQALGEVVRGLDLYGLDVR	240
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	181	VYARLALYGADFLMQEKVNDWNSIEEINEETIRLREEVNLYQALQDVVRLDLYGVDVR	240
<i>S. mutans</i> GS-5	241	KPAMNVKEAIQWINIAFMAVCRVINGAATSLGRVPIVLDIFAERDLARGTFTSEIQEFV	300
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	241	RPAFDTKEAIQWTNIAFMAVCRVINGAATSLGRVPIVLDIYAERDLARGTYTSEIQEFV	300
<i>S. mutans</i> GS-5	301	DDFVVKLRITVKFARTKAYDELYSGDPTFITTSMAGMGADGRHRVTKMDYRFLNLTLDNIGN	360
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	301	DDFV+KLRITVKFARTKAYDELYSGDPTFITTSMAGMGADGRHRVTKMDYRFLNLTLDNIGN	360
<i>S. mutans</i> GS-5	361	APEPNLTVLWSSKLPYSFRHYCMSMSHKHSSIQYEGVTTMAKEGYGEMSCISCCVSPIDP	420
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	361	APEPNLTVLWS KLPYSFR YCM MSHKHSSIQYEGVTTMAK+GYGEMSCISCCVSPIDP	420
<i>S. mutans</i> GS-5	421	ENEDRRHNLYQYFGARVNVLKALLTGLNGGYDDVHKDYKVFDEVEPIRDEVLDVFETVKANFE	480
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	421	ENEQRHNIQYF+GARVNVLKALLTGLNGGYDDVHKDYKVF++P+RDEVLDVF+TVKANFE	480
<i>S. mutans</i> GS-5	481	KALDWLTDTYVDAMNIIHYMTDKYNYEAVQMAFLPTRVKANMGFGICGFSNTVDLSLSAIAK	540
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	481	KSLDWLTDTYVDALNIIHYMTDKYNYEAVQMAFLPT+ +ANMGFGICGF+NTVD+LSAIAK	540
<i>S. mutans</i> GS-5	541	YATVKPIRDEEDGYIYDYETVGNFPRYGEDDDRVDLSIAEWLLEAFHTRLARHKLYKDSEAT	600
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	541	YATVKPIRDEEDGYIYDYET+G +PR+GEDD R + +AEWL+EA+ TRL HKLYKD+EAT	600
<i>S. mutans</i> GS-5	601	VSLLTITSNVAYSQKQTGNSPVHKGVYLNEDGSVNLSKVEFFSPGANPSNKASGGWLQNLN	660
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	601	VSLLTITSNVAYSQKQTGNSPVHKGVYLNEDGSVNLSK+EFFSPGANPSNKA GGWLQNLN	660
<i>S. mutans</i> GS-5	661	SLKKLDFAHANDGISLTTQVSPKALGKTDFEQVANLVTILDGYFEGGGQHVNLNVMDLKD	720
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	661	SLASLDFGYAADGISLTTQVSPRALGKTRDEQVDNLVTILDGYFENGGQHLNLNVMDLSA	720
<i>S. mutans</i> GS-5	721	VYDKIMNGEDVIVRISGYCVNTKYLTKKEQKTELTRQVVFHEVLSMDDAATDLVNNK 775	
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	721	VYKIMNGEDVIVRISGYCVNTKYLTPKEQKTELTRQVVFHEVLSRDDAMG----- 769	

Fig. 4 Sequence alignments of pyruvate formate-lyase from *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus mutans*. Each catalytic and radical formation domains are shown as gray and white box. Each accession numbers are as follows; YP\_006489670 (*S. mutans* GS-5) and YP\_140075 (*S. thermophilus* LMG18311).

経済的効果をもたらすとともに、*L. bulgaricus* 由来の機能性菌体外多糖生産の増加も期待できる。そのためには、原料乳中の酸素除去ならびに糖の種類と含量の制御などの因子解析は極めて重要と考えられる。

本稿では *E. coli* および *S. mutans* によるギ酸生成を中心に考察した。PFL は非常に高い酸素感受性を有しているため、本酵素に関する研究はその特性から困難を

極めることが予想されるが、今後、*S. thermophilus* の PFL の機能に関して、全容解明がなされることを願ってやまない。

## 引用文献

- 1) Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. and Hugenholtz, J.: Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4542–4548 (2003)
- 2) Driessen, F. M., Kingma, F. and Stadhouders, J.: Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, **36**, 135–144 (1982)
- 3) Sieuwerts, S., de Bok, F. A., Hugenholtz, J. and van Hylckama Vlieg, J. E.: Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4997–5007 (2008)
- 4) Suzuki, I., Kato, S., Kitada, T., Yano, N. and Morichi, T.: Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 1. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk. *J. Dairy Sci.*, **69**, 311–320 (1986)
- 5) Suzuki, I., Kato, S., Kitada, T., Yano, N. and Morichi, T.: Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 2. Characteristics of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides, and nucleic acid synthesis. *J. Dairy Sci.*, **69**, 971–978 (1986)
- 6) Nishimura, J., Kawai, Y., Aritomo, R., Ito, Y., Makino, S., Ikegami, S., Isogai, E. and Saito, T.: Effect of formic acid on exopolysaccharide production in skim milk fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Biosci. Microb. Food Health*, **32**, 23–32 (2013)
- 7) Stephenson, M. and Stickland, L. M.: Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem. J.*, **25**, 205–214 (1931)
- 8) Kim, B. H. and Gadd, G. M.: Bacterial physiology and metabolism, Cambridge University Press, 272–273 (2008)
- 9) Moat, A. G. and Foster, J. W.: Microbial physiology (third edition), Wiley-Liss, 330–335 (2002)
- 10) Peck, H. D. Jr. and Gest, H.: Formic dehydrogenase and the hydrogenlyase enzyme complex in coli-aerogenes bacteria. *J. Bacteriol.*, **73**, 706–721 (1957)
- 11) Sawers, R. G.: Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 42–46 (2005)
- 12) Maeda, T. and Ogawa, H.: Metabolic engineering and protein engineering for *Escherichia coli* to enhance bacterial hydrogen production. *J. Environ. Biotechnol.*, **9**, 69–74 (2009)
- 13) Bagramyan, K. and Trchounian, A.: Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. *Biochem. (Mosc)*, **68**, 1159–1170 (2003)
- 14) Magalon, A., Blokesch, M., Zehelein, E. and Böck, A.: Fidelity of metal insertion into hydrogenases. *FEBS Lett.*, **499**, 73–76 (2001)
- 15) Sanchez-Torres, V., Maeda, T. and Wood, T. K.: Protein engineering of the transcriptional activator FhlA to enhance hydrogen production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5639–5646 (2009)
- 16) Suppmann, B. and Sawers, G.: Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: Identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter. *Mol. Microbiol.*, **11**, 965–982 (1994)
- 17) Lü, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. and Einsle, O.: pH-Dependent gating in a FocA formate channel. *Science*, **332**(6027), 352–354 (2011)
- 18) Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. and Guest, J. R.: A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiol.*, **143**, 3633–3647 (1997)
- 19) Clark, D. P.: The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **5**, 223–234 (1989)
- 20) Dharmadi, Y., Murarka, A. and Gonzalez, R.: Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, **94**, 821–829 (2006)
- 21) Trchounian, K., Poladyan, A., Vassilian, A. and Trchounian, A.: Multiple and reversible hydrogenases for hydrogen production by *Escherichia coli*: dependence on fermentation substrate, pH and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **47**, 236–249 (2012)
- 22) Smith, E. G. and Spatafora, G. A.: Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environ-

- ment. *J. Dent. Res.*, **91**, 133–141 (2012)
- 23) Nishimura, J, Saito, T., Yoneyama, H., Bai, L-L., Okumura, K. and Isogai, E.: Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and related bacteria. *Adv. Microbiol.*, **2**, 208–215 (2012)
- 24) Takahashi, N., Iwami, Y. and Yamada, T.: Metabolism of intracellular polysaccharide in the cells of *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**, 299–304 (1991)
- 25) 山本康人: *Streptococcus mutans* におけるピルビン酸・ギ酸リアーゼ遺伝子 (*pfl*) 発現の解析とピルビン酸・ギ酸リアーゼ活性化酵素遺伝子 (*act*) の機能解析, 歯科学報, **101**, 506–514 (2001)
- 26) 山田 正: 歯垢微生物の糖代謝—*in vitro* と *in vivo*—, 生化学, **73**, 239–246 (2001)
- 27) Wagner, A. F., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schäfer, W. and Knappe, J.: The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 996–1000 (1992)
- 28) Abbe, K. and Yamada, T.: Purification and properties of pyruvate kinase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, **149**, 299–305 (1982)
- 29) Yamada, T., Takahashi-Abbe, S. and Abbe, K.: Effects of oxygen on pyruvate formate-lyase in situ and sugar metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.*, **47**, 129–134 (1985)
- 30) Takahashi, N., Abbe, K., Takahashi-Abbe, S. and Yamada, T.: Oxygen sensitivity of sugar metabolism and interconversion of pyruvate formate-lyase in intact cells of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.*, **55**, 652–656 (1987)
- 31) Takahashi, S., Abbe, K. and Yamada, T.: Purification of pyruvate formate-lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *J. Bacteriol.*, **149**, 1034–1040 (1982)
- 32) Cappiello, M. G., Hantman, M. J., Zuccon, F. M., Peruzzi, F., Amjad, M., Piggot, P. J. and Daneo-Moore, L.: Physical and genetic map of *Streptococcus mutans* GS-5 and localization of five rRNA operons. *Oral Microbiol. Immunol.*, **14**, 225–232 (1999)
- 33) Yamamoto, Y., Sato, Y., Takahashi-Abbe, S., Abbe, K., Yamada, T. and Kizaki, H.: Cloning and sequence analysis of the *pfl* gene encoding pyruvate formate-lyase from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **64**, 385–391 (1996)
- 34) Yamamoto, Y., Sato, Y., Takahashi-Abbe, S., Takahashi, N. and Kizaki, H.: Characterization of the *Streptococcus mutans* pyruvate formate-lyase (PFL)-activating enzyme gene by complementary reconstitution of the *in vitro* PFL-reactivating system. *Infect. Immun.*, **68**, 4773–4777 (2000)
- 35) Takahashi-Abbe, S., Abe, K. and Takahashi, N.: Biochemical and functional properties of a pyruvate formate-lyase (PFL)-activating system in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **18**, 293–297 (2003)
- 36) Conradt, H., Hohmann-Berger, M., Hohmann, H. P., Blaschkowski, H. P. and Knappe, J.: Pyruvate formate-lyase (inactive form) and pyruvate formate-lyase activating enzyme of *Escherichia coli*: isolation and structural properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**, 133–142 (1984)
- 37) Knappe, J., Blaschkowski, H. P., Gröbner, P. and Schmitt, T.: Pyruvate formate-lyase of *Escherichia coli*: the acetyl-enzyme intermediate. *Eur. J. Biochem.*, **50**, 253–263 (1974)
- 38) Wang, S. C. and Frey, P. A.: S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *TRENDS Biochem. Sci.*, **32**, 101–110 (2007)
- 39) Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S. and Volker Wagner, A. F.: Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 969–975 (1999)
- 40) Wong, K. K., Murray, B. W., Lewis, S. A., Baxter, M. K., Ridky, T. W., Ulissi-DeMario, L. and Kozarich, J. W.: Molecular properties of pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Biochem.*, **32**, 14102–14110 (1993)
- 41) Kessler, D., Leibrecht, I. and Knappe, J.: Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS Lett.*, **281**, 59–63 (1991)
- 42) Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M. Y. and Rul, F.: Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8597–8605 (2005)
- 43) Asanuma, N., Iwamoto, M. and Hino, T.: Structure and transcriptional regulation of the gene encoding pyruvate formate-lyase of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. *Microbiol.*, **145**, 151–157



- (1999)
- 44) Uemura (Nishimura), J., Itoh, T., Kaneko, T. and Oda, K.: Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Milchwissenschaft*, **53**, 443–446 (1998)
- 45) Uemura (Nishimura), J., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., Oda, M. and Saito, T.: Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Food Microbiol.*, **20**, 267–273 (2003)
- 46) 西村順子・齋藤忠夫：細菌における細胞分裂メカニズムと乳酸菌の形態変化について，*ミルクサイエンス*，**60**，111–117 (2011)
- 47) Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S. A., Beerthuyzen, M., Stevens, M. J., Janssen, P. W., Ingham, C. J., de Bok, F. A., de Vos, W. M. and van Hylckama Vlieg, J. E.: Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 7775–7784 (2010)