

Lactobacillus plantarum WCFS1 の低温、 低 pH 環境での遺伝子発現解析

八十川大輔, 橋渡 携

Global Transcriptional Analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 at Low Temperature and Low pH

Daisuke Yasokawa and Tazusa Hashido

Due to a cool climate, grapes harvested in Hokkaido tend to contain more acid than those in the southern part of Japan. Crucial to the production of high-quality wine in Hokkaido is reduction in the sour taste associated with higher levels of acidity. To test the hypothesis that Hokkaido is too cool for the activation of malolactic fermentation, genome-wide expression profiling of the response to low temperature/low pH in the lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* WCFS1 was performed, since *L. plantarum* decarboxylates L-malate to L-lactate. The biological characteristics of upregulated open reading frames were assigned and analyzed according to the KEGG PATHWAY database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>). Significant induction of sugar transport system was observed in low temperature/low pH. Furthermore, transcription of malate transport protein gene (lp_1119) and malolactic enzyme gene (lp_1118) were strongly upregulated in the same conditions. This response indicates that *L. plantarum* suffers from energy shortage.

北海道はその冷涼な気候風土から酸味の強いブドウが収穫され、ワイン醸造においてはその酸味の低減が重要な課題となっている。乳酸菌によるマロラクティック発酵は、ブドウ果汁中のリンゴ酸を乳酸に変換することによる減酸技術であるが、秋から冬の北海道のワイナリーでは蔵の温度が低すぎるによりマロラクティック発酵はおきにくいと考えられてきた。当センターと池田町ブドウ・ブドウ酒研究所との共同研究などにより、ワイン中に低温、低 pH でも良好に働くマロラクティック乳酸菌が存在することを見だし、その分離培養に成功している。

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、その生物の全遺伝子（ゲノム）の発現についての情報を網羅的に取得できる方法であり、異なる環境での微生物の遺伝子発現動態を知るための非常に有力な技術である¹⁾。しかしながら現時点では低温、低 pH で働く当該マロラクティック乳酸菌株のゲノム解析は行われておら

ず、遺伝子発現解析技術を直接本菌株に適用することはできない。乳酸桿菌 *Lactobacillus plantarum* はマロラクティック発酵を行うことが知られており^{2,3)}、かつ、WCFS1 株については既にゲノム解析が終了し DNA マイクロアレイも市販されている。そこで、本研究では *L. plantarum* WCFS1 株を低温 (15°C)、低 pH (pH 3.3) で培養し、中温 (30°C)、弱酸性 (pH 4.8) で培養した場合と比較することにより、低温、低 pH がマロラクティック発酵乳酸菌の遺伝子発現に与える影響について検討した。

実験方法

培養は pH 調整を行った 143 培地 (1% Casein peptone tryptic digest, 0.5% 酵母エキス, 1% グルコース, 0.5% フルクトース, 0.02% 硫酸マグネシウム七水和物, 0.005% 硫酸マンガン水和物, 0.35% クエン酸二アンモニウム, 0.1% (v/v) ツイーン 80, 10%

(v/v) トマトジュース濾液, 0.05% 塩酸 L-システイン二水和物) を用い, 密栓したチューブで静置培養した. 30°C で pH 4.8 および 15°C で pH 3.3 の 2 条件で培養した. 各培養とも対数増殖期中期の菌体を迅速に回収し液体窒素で速やかに凍結後, RNA 調製まで -85°C で保存した. RNA の抽出から, 精製, RNA の定量および定性的評価, 蛍光ラベル, ハイブリダイゼーション, スキャナーでの読み取り, 正規化データの作成は北海道システムサイエンス株式会社に外注した. チップは NimbleGen 社製, 遺伝子搭載数 3,059 遺伝子, プローブ数は 1 遺伝子あたり 12 プローブ × 5 反復, プローブ長は 60 mer であった. スキャナーはアジレント社製マイクロアレイスキャナを用いた.

実験結果および考察

L. plantarum WCFS1 株は通性ヘテロ発酵型に属し, ゲノム解析が完了した乳酸桿菌で⁴⁾, 発現解析も用いられている代表的な株である. これまでに, 当菌株を用いて自ら作り出す乳酸の影響⁵⁾, フラクトオリゴ糖の代謝⁶⁾, 過酸化水素の影響⁷⁾, 胆汁酸耐性機構⁸⁾ などについての遺伝子発現解析が行われている.

使用した培養条件は 143 培地において 30°C, pH 4.8 培養と, 15°C, pH 3.3 培養として, 対数増殖期における遺伝子発現の比較を行った. その際の増殖曲線およびサンプリング時期を図 1 に示した.

本発現解析実験では, 上記培養条件で培養した菌体から抽出した RNA を用いた. 精製した RNA は各培養条件で 1 サンプルで, DNA チップ上のプローブは 2 反復で固定されているので同じ遺伝子のプローブにおける蛍光シグナルの平均値をその遺伝子の発現量とした. 15°C

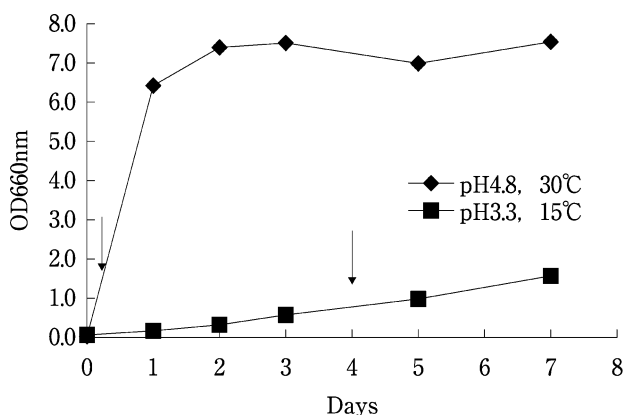


図 1. *L. plantarum* WCFS1 株の pH 4.8, 30°C および pH 3.3, 15°C での増殖曲線
RNA のサンプリングはそれぞれ矢印 (↓) のタイミング (pH 3.3, 15°C : 4 day および pH 4.8, 30°C : 6 hr) で行った.

で pH 3.3 の培養から調製した試料の正規化データ値が 30°C で pH 4.8 の培養から調製した試料の当該データ値の 2 倍以上である場合を発現上昇とした.

15°C, pH 3.3 で培養した乳酸菌と 30°C, pH 4.8 で培養した乳酸菌での遺伝子発現量を比較した. 低温, 低 pH 条件において 2 倍以上発現上昇を示した遺伝子数は 494 遺伝子で, *L. plantarum* 全 ORF (3,059 ORF) 中約 16.1% が発現上昇した. 逆に 1/2 未満に発現抑制された遺伝子数は 482 遺伝子 (約 15.8%) であった.

発現上昇した ORF のうち上位 50 ORF について表 1 にまとめた. 上位 50 ORF には輸送系の遺伝子が 11 遺伝子も含まれており, 細胞表層遺伝子を含めると 15 (35%) の細胞膜局在タンパクの遺伝子が発現上昇していることが判明した. これは, 上位 10 遺伝子で見るとより明瞭であり, 10 遺伝子中 lp0733 (28.6 倍), lp1119 (24.0 倍), lp3548 (22.4 倍), lp3547 (21.7 倍), lp3527 (19.9 倍), lp3010 (19.8 倍), lp3546 (19.0 倍) の 7 遺伝子が輸送系の遺伝子であった.

更に, 細菌の糖の輸送系に重要なホスホエノールピルビン酸依存性の糖ホストランスフェラーゼ系 (PTS 系) の多くが発現上昇していることから, ホスホエノールピルビン酸の供給系を確認したところ, lp_1920 (phosphopyruvate hydratase) 及び lp_1912 (phosphoenolpyruvate synthase) はそれぞれ 8.59 倍および 5.76 倍発現上昇していた.

また, 低温 (15°C), 低 pH (pH 3.3) で培養するだけでリンゴ酸輸送蛋白 lp_1119 が 24.0 倍, マロラクティック酵素 (malate dehydrogenase) lp_1118⁹⁾ が 14.4 倍発現上昇していた. しかしながら, リンゴ酸-乳酸代謝経路に関与する遺伝子のうち, lp_1082 (malate / lactate dehydrogenase) は 3.44 倍に発現上昇を示したものの, lp_1105 (malic enzyme, NAD-dependent) は 1.37 倍, lp_0537 (L-lactate dehydrogenase), lp_1101 (L-lactate dehydrogenase), lp_1245 (L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase), lp_2349 (L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase), および lp_2057 (D-lactate dehydrogenase) はそれぞれ 1.53 倍, 1.58 倍, 0.94 倍, 1.02 倍および 0.85 倍と, 30°C & pH 4.8 での培養環境中とあまり変化のない発現量であった. lp_0594 (malate transport enzyme) は 0.79 倍, lp_2829 (malate transport protein (putative)) は 0.75 倍, lp_3150 (malate dehydrogenase (putative)) は 0.52 倍と一見上記結果と矛盾するようなデータも得られており, これらについては今後の研究が待たれる. malate dehydrogenase と malate

表 1. pH 3.3, 15°C培養において pH 4.8, 30°C培養に比べ 2 倍以上発現上昇した遺伝子上位 50 ORF

SEQ_ID	Fold	GENE_NAME	FUNCTION
TI220668S000620	28.6	lp_0733	phosphate ABC transporter, substrate binding protein
TI220668S000932	24.0	lp_1119	malate transport protein
TI220668S002885	22.4	lp_3548	galactitol PTS, EIIA
TI220668S002666	21.7	lp_3271	guanosine 5'-monophosphate oxidoreductase
TI220668S002884	19.9	lp_3547	galactitol PTS, EIIB
TI220668S002867	19.8	lp_3527	beta-glucosides PTS, EIIBCA
TI220668S000765	19.0	lp_0907	DedA protein
TI220668S002464	17.1	lp_3010	cellobiose PTS, EIIC
TI220668S002519	17.0	lp_3077	extracellular protein (putative)
TI220668S002883	15.9	lp_3546	galactitol PTS, EIIC
TI220668S001160	15.0	lp_1402	transport protein
TI220668S000931	14.4	lp_1118	malolactic enzyme
TI220668S002866	14.3	lp_3526	6-phospho-beta-glucosidase
TI220668S002882	12.5	lp_3545	L-idoitol 2-dehydrogenase
TI220668S001161	11.4	lp_1403	cell surface protein, ErfK family
TI220668S002887	11.1	lp_3551	putative phosphoketolase
TI220668S001792	11.1	lp_2153	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit
TI220668S001260	10.8	lp_1521	oxidoreductase
TI220668S002463	10.3	lp_3009	cellobiose PTS, EIIB
TI220668S000795	10.1	lp_0946	cell surface protein precursor, GY family
TI220668S000238	9.5	lp_0289	hypothetical protein
TI220668S000718	9.5	lp_0849	pyruvate oxidase
TI220668S002554	9.2	lp_3117	cell surface protein (putative)
TI220668S002851	9.1	lp_3509	N-acetylglucosamine kinase (putative)
TI220668S002665	9.1	lp_3270	adenylosuccinate synthase
TI220668S002104	8.8	lp_2537	homoserine O-succinyltransferase
TI220668S000328	8.7	lp_0393	galactoside O-acetyltransferase
TI220668S002960	8.6	lp_3632	hypothetical protein
TI220668S002121	8.6	lp_2560	ATP phosphoribosyltransferase
TI220668S001594	8.6	lp_1920	phosphopyruvate hydratase
TI220668S002667	8.5	lp_3272	protein-tyrosine phosphatase
TI220668S002289	8.3	lp_2777	6-phospho-beta-glucosidase
TI220668S002103	8.3	lp_2536	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase
TI220668S000329	8.2	lp_0394	transport protein
TI220668S001437	8.2	lp_1730	maltose phosphorylase
TI220668S001510	7.9	lp_1816	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase
TI220668S001791	7.7	lp_2152	pyruvate dehydrogenase complex, E2 component; dihydrolipoamide S-acetyltransferase
TI220668S002876	7.6	lp_3539	transaldolase
TI220668S000110	7.6	lp_0136	oxidoreductase
TI220668S002850	7.6	lp_3508	hypothetical protein
TI220668S000311	7.5	lp_0370	glycerol kinase
TI220668S002852	7.4	lp_3510	hypothetical protein
TI220668S000239	7.4	lp_0290	transcription regulator
TI220668S000481	7.4	lp_0574	hypothetical protein
TI220668S002986	7.3	lp_3660	ribokinase
TI220668S001438	7.2	lp_1731	aldose 1-epimerase
TI220668S001436	7.2	lp_1729	sugar transport protein (putative)
TI220668S000331	7.2	lp_0396	transcription regulator
TI220668S001746	7.2	lp_2098	lipoprotein precursor
TI220668S002415	7.2	lp_2942	transcription regulator

permease (transport protein) はグルコースによりカタボライト抑制を受けることが知られている¹⁰⁾が、低温かつ低 pH ではこの抑制が外れる可能性が示唆された。

さらに、どのような遺伝子が2倍以上発現上昇しているのかについて KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) での遺伝子分類に従い解析した。

表2では Metabolism (代謝) に関する遺伝子群について解析した。Carbohydrate metabolism (炭水化物代謝) に属する遺伝子 241 遺伝子中 74 遺伝子 (30.7%)、Energy metabolism (エネルギー代謝) に属する遺伝子 61 遺伝子中 16 遺伝子 (26.2%) が発現上昇していた。これらのことは、低温かつ低 pH 環境において、より多くのエネルギー獲得関連遺伝子を発現しないと上手く増殖できないことを示している。表3および表4に Metabolism に属する遺伝子のうち Carbohydrate metabolism および Energy metabolism のサブカテゴリーに属する小カテゴリーごとの解析結果を示した。サブカテゴリー Carbohydrate metabolism では、属する遺伝子数は少ないものの、Pentose and glucuronate interconversions が 9 遺伝子中 6 遺伝子 (66.7%) と強く発現上昇しており、その他 Galactose metabolism, Butanoate metabolism, Citrate cycle, および Fructose and mannose metabolism がそれぞれ 31 遺伝子中 13 遺伝子 (41.9%), 21 遺伝子中 8 遺伝子 (38.1%), 14 遺伝子中 5 遺伝子 (35.7%), および 34 遺伝子中 12 遺伝子 (35.3%) と発現上昇していた (表3)。サブカテゴリー Energy metabolism では、Reductive carboxylate cycle が 9 遺伝子中 4 遺伝子

(44.4%)、Nitrogen metabolism が 16 遺伝子中 5 遺伝子 (31.3%) などが発現上昇していた (表4)。これらのことは低温、低 pH 環境の *L. plantarum* がエネルギー不足に陥っている可能性を示唆している。表5に Environmental information processing (環境情報処理) に関する遺伝子群についてまとめた。その結果、Electron transfer carriers は 3 遺伝子の全て (100%)、Phosphotransferase system では 63 遺伝子中 26 遺伝子 (41.3%) などの発現上昇を認めた。これらのことも、低温低 pH 環境における *L. plantarum* の強い飢餓仮説を支持していると考えられた。

L. plantarum のようなマロラクティック乳酸菌にとってのマロラクティック発酵の生物学的意義について考えると、生化学反応そのものではエネルギー収支的には利益がなく、また、リンゴ酸から乳酸への変換による 0.2 程度の pH 上昇も、さほどマロラクティック乳酸菌にとって意義のある変化とは言えないと考えられてきたが、Cox と Henick-Kling^{11,12)} によりマロラクティック反応前後で細胞膜内外にプロトン駆動力が働き、それを利用した ATP 産生が起きることが示された。更に、Olsen ら¹³⁾ により、細胞外に一定濃度以上でリンゴ酸が存在する場合、リンゴ酸がモノアニオンの形で取り込まれ、マロラクティック発酵後、乳酸が非解離型で排出されることによりプロトン濃度勾配が形成されるというモデルが提示された。マロラクティック発酵は低温で低 pH 環境によりエネルギー不足 (飢餓) に陥ったマロラクティック乳酸菌にとって生存のために必要な代謝系の一つではないかと推定された。

表2. pH 3.3, 15°C培養において pH 4.8, 30°C培養の2倍以上発現上昇した遺伝子のうち Metabolism に関する遺伝子数

	Entries	From input list	/Entries (%)	/Input list (%)
METABOLISM	624	136	21.8	27.5
Carbohydrate metabolism	241	74	30.7	15.0
Energy metabolism	61	16	26.2	3.2
Lipid metabolism	73	11	15.1	2.2
Nucleotide metabolism	87	6	6.9	1.2
Amino acid metabolism	184	37	20.1	7.5
Metabolism of other amino acids	49	8	16.3	1.6
Glycan biosynthesis and metabolism	20	3	15.0	0.6
Biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides	7	2	28.6	0.4
Metabolism of cofactors and vitamins	81	6	7.4	1.2
Biosynthesis of secondary metabolites	34	3	8.8	0.6
Xenobiotics biodegradation and metabolism	28	4	14.3	0.8

Entries はそのカテゴリーまたはサブカテゴリーに含まれる遺伝子の数, From input list は発現上昇した 494 遺伝子中そのカテゴリーまたはサブカテゴリーに含まれる遺伝子数, /Entries (%)はそのカテゴリーまたはサブカテゴリーの遺伝子中で発現上昇した遺伝子のパーセンテージ, /Input list (%)は発現上昇した 494 遺伝子中でそのカテゴリーまたはサブカテゴリーに含まれる遺伝子のパーセンテージを表す。

表 3. サブカテゴリー Carbohydrate metabolism (表 2 参照) に属する遺伝子で 2 倍以上発現上昇した遺伝子数

	Entries	From input list	/Entries (%)	/Input list (%)
Carbohydrate metabolism	241	74	30.7	15.0
Glycolysis/Gluconeogenesis	47	13	27.7	2.6
Citrate cycle	14	5	35.7	1.0
Pentose phosphate pathway	24	6	25.0	1.2
Pentose and glucuronate interconversions	9	6	66.7	1.2
Fructose and mannose metabolism	34	12	35.3	2.4
Galactose metabolism	31	13	41.9	2.6
Ascorbate and aldarate metabolism	5	1	20.0	0.2
Starch and sucrose metabolism	40	13	32.5	2.6
Aminosugars metabolism	15	2	13.3	0.4
Nucleotide sugars metabolism	10	2	20.0	0.4
Pyruvate metabolism	39	11	28.2	2.2
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	10	1	10.0	0.2
Propanoate metabolism	19	2	10.5	0.4
Butanoate metabolism	21	8	38.1	1.6
C5-Branched dibasic acid metabolism	2	0	0.0	0.0
Inositol metabolism	6	0	0.0	0.0
Inositol phosphate metabolism	11	2	18.2	0.4

表 4. サブカテゴリー Energy metabolism (表 2 参照) に属する遺伝子で 2 倍以上発現上昇した遺伝子数

	Entries	From input list	/Entries (%)	/Input list (%)
Energy metabolism	61	16	26.2	3.2
Oxidative phosphorylation	20	4	20.0	0.8
Carbon fixation	14	4	28.6	0.8
Reductive carboxylate cycle	9	4	44.4	0.8
Methane metabolism	4	1	25.0	0.2
Nitrogen metabolism	16	5	31.3	1.0
Sulfur metabolism	8	1	12.5	0.2
Pyruvate/Oxoglutarate metabolism	0	0	0.0	0.0
ATPases	1	1	100.0	0.2

表 5. Environmental information processing に関与する遺伝子で、2 倍以上発現上昇した遺伝子数

	Entries	From input list	/Entries (%)	/Input list (%)
ENVIRONMENTAL INFORMATION PROCESSING	271	74	27.3	15.0
Membrane transport	235	67	28.5	13.6
ABC transporters	106	29	27.4	5.9
Other ion-coupled transporters	44	6	13.6	1.2
Pores ion channels	4	0	0.0	0.0
Electron transfer carriers	3	3	100.0	0.6
Other transporters	4	1	25.0	0.2
Phosphotransferase system	63	26	41.3	5.3
Signal transduction	41	12	29.3	2.4
Two-component system	41	12	29.3	2.4
Signaling molecules and interaction	0	0	0.0	0.0

L. plantarum の細胞内 pH は 4.6~4.8 が下限であり、細胞外 (培地) pH は 3.0 でも増殖可能である¹⁴⁾。
Leuconostoc mesenteroides の細胞内 pH の下限域は pH 5.4~5.7 であり、*L. plantarum* よりも pH 耐性が低い。これは細胞内外の pH 差が大きくなり過ぎないように

に細胞内 pH を下げる能力が低いとされている¹⁴⁾。
一方で細菌の細胞内 pH の安定は、主にプロトン-ATPase が担っており、ATP を消費してプロトンを排出している¹⁵⁾。生存可能範囲でも低 pH 域で細菌の増殖が阻害されている大きな要因の一つはこの ATP の消費

にあり、今回の発現解析においてもそのことが示されたと考えられる。

佐々木らは、*L. gasseri* LG21 株のマイクロアレイを用いて、耐酸性および酸適応について解析を行っている¹⁶⁾。その中で、MRS 液体培地中において pH6.5 から 4.8 に pH を急速に下げた後 30 分の間に複数のカチオン ABC transporter や、多数の PTS 系輸送体遺伝子、糖輸送遺伝子、アミノ酸/有機酸アンチポーターの著しい転写促進があったことを記している。さらにこれらの転写促進された遺伝子群の多くがエネルギー生産や変換に関連することから、酸適応がエネルギー生産や変換に依存する減少であろうと考察している。これらの転写促進遺伝子群は、今回の *L. plantarum* での発現解析実験でも誘導されており、必ずしも短時間の酸適応特異的な現象ではないと考えられる。更に佐々木らは脱炭酸的リン酸化によるエネルギー生成系に着目している。この脱炭酸反応系は、有機酸やアミノ酸が細胞内に取り込まれ脱炭酸によって細胞内のアルカリ化が起こるとともに ATP が生成され反応物は細胞外に排出されるという、酸耐性メカニズムとしてはきわめて効率的なものである¹⁷⁾。今回の *L. plantarum* の 15°C pH 3.3 培養においても 30°C pH 4.8 培養に比べ、glutamate decarboxylase が 3.9 倍の発現上昇を示しており、またマロラクティック発酵そのものがリンゴ酸から乳酸への脱炭酸反応である (14.4 倍の上昇)。

今後様々なマイクロアレイを用いた発現解析を行うことにより、微生物ゲノムの網羅的な転写調節機構の解明につながり、経験と勘に頼っていた発酵技術を科学的合理的なものにすることが可能になると期待している。

要 約

L. plantarum の 15°C, pH 3.0 培養時と 30°C, pH 4.8 培養時の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより比較解析したところ、低温、低 pH 培養により様々な輸送系の遺伝子やエネルギー獲得系遺伝子が強く発現誘導されていることから、*L. plantarum* は強い飢餓状態にあるものと推定された。また、同条件下でマロラクティック発酵に必要なリンゴ酸トランスポーターやリンゴ酸デヒドロゲナーゼも強く発現していた。このことはマロラクティック発酵が飢餓状態にあるマロラクティック乳酸菌にとって、生存に必要な代謝系の一つである可能性を示唆している。

今後、低温と低 pH のどちらか一方がマロラクティック発酵関連遺伝子発現上昇に貢献しているのか、あるい

は両方が相まってそのような結果になっているのかなどを分析する必要がある。

文 献

- 1) Shalon, D., Smith, S. J., and Brown, P. O., A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.*, **6**, 639-645 (1996).
- 2) Korkes, S. and Ochoa, S., Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, **176**, 463-464 (1948).
- 3) Caspritz, G. and Ferdinand Radle, F., Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4907-4910 (1983).
- 4) Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W. E. J., Stiekema, W., Lankhorst, R. M. K., Bros, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M. and Siezen, R. J., Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1990-1995 (2003).
- 5) Pieterse, B., Leer, R. J., Schuren, F. H. J. and van der Werf, M. J., Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*, **151**, 3881-3894 (2005).
- 6) Saulnier, D. M. A., Molenaar, D., de Vos, W. J., Gibson, G. R. and Kolida, S., Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1753-1765 (2007).
- 7) Serrano, L. M., Molenaar, D., Wels, M., Teusink, B., Bron, P. A., de Vos, W. M. and Smid, E. J., Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb. Cell Fact.*, **6**, 1-14 (2007).
- 8) Bron, P. A., Molenaar, D., de Vos, W. M. and Kleerebezem, M., DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus*

- plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 728-738 (2006).
- 9) Caspritz, G. and Radler, F., Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. purification, properties, and distribution among bacteria. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4907-4910 (1983).
- 10) London, J., Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 103-111 (1990).
- 11) Cox, D. J. and Henick-Kling, T., Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.*, **171**, 5750-5752 (1989).
- 12) Cox, D. J. and Henick-Kling, T., A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 215-218 (1990).
- 13) Olsen, E. B., Russell, J. B. and Henick-Kling, T., Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.*, **173**, 6199-6206 (1991).
- 14) McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M., Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2120-2124 (1990).
- 15) Kobayashi, H., A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**, 72-76 (1985).
- 16) 佐々木泰子, 5. DNA マイクロアレイを用いた乳酸菌と腸内細菌の解析, 「腸内フローラとクロストーク 腸内フローラシンポジウム 15」, 初版, 伊藤喜久治編, (学会出版センター, 東京), pp.61-86 (2008).
- 17) 阿部敬悦, 脱炭酸反応に共役したエネルギー生成系の産業利用, バイオサイエンスとバイオインダストリー, **62**, 651-656 (2004).