

# バクテリアの芳香族アミノ酸代謝にかかわるタンパク質に関する研究

片山 高嶺

(京都大学大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻)

## 目的:

芳香族アミノ酸は、医薬品をはじめとする基礎化成品あるいは飼料添加物として多大な需要があるにもかかわらず、現在まで十分には供給されていない。本課題は、バクテリアによる芳香族アミノ酸生産の基盤を整えることを目的とする。研究の主な対象は、1)芳香族アミノ酸の輸送を担うトランスポーター、および 2)芳香族アミノ酸代謝において中心的役割を担う転写調節因子 TyrR、である。アミノ酸生合成過程の個々の反応を担う酵素については、これまでに詳細な研究が行われてきたが、発現調節因子やトランスポーターに関しては研究が進んでいない。これらのタンパク質の機能を分子生物学的手法を用いて解明することは、芳香族アミノ酸生産の発展に大きく貢献するものである。

## 1) 芳香族アミノ酸トランスポーターについて

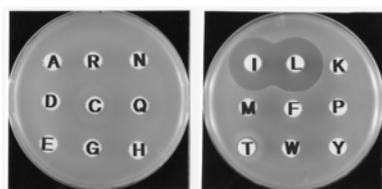
### a) 大腸菌における第三のフェニルアラニン(Phe)取り込み系<sup>1)</sup>

以前の研究において、大腸菌の既知の芳香族アミノ酸トランスポーターすべてを破壊した株 (*rph-1 ΔaroP ΔtryP Δmtr ΔpheP Δtna*) がエネルギー依存的なPhe取り込み能を示すことを見出していた。この活性は、他のアミノ酸トランスポーターによるものと推測し、Fig. 1 (A) に示すような生育阻害実験をおこなった。Pheを含む最少培地上に各アミノ酸 (Val と Ser を除く) を染み込ませたディスクを置き、その上にPhe要求性/芳香族アミノ酸トランスポーターの破壊株 (*rph-1 ΔaroP ΔtryP Δmtr ΔpheP Δtna pheA18::Tn10*) の懸濁液を重層した。本菌株の生育はPheの取り込みに依存するために、その取り込みを阻害する物質の共存下では生育が阻害されると考えられた。その結果、Leu と Ile の周りに生育阻止円が観察された。また Fig. 1 (B) に示したように、本菌株のPhe取り込み活性は、Val および Leu の共存下で著しく阻害された。以上のことから、分岐鎖アミノ酸トランスポーターが、第三のPhe取り込み系として機能することが強く示唆された。

大腸菌において分岐鎖アミノ酸はLIV-I/LSおよびBrnQの2つのシステムにより取り込まれる。LIV-I/LSはABCトランスポーターであり、2種の基質結合タンパク質LIV-BP (binding protein) (*livJ*) とLS-BP (*livK*)、および膜チャネルLivHMGFから構成されている。BrnQは一分子からなる膜貫通型トランスポーターである。どちらかがPhe取り込み

に關与しているものと考え、遺伝子破壊株(  $\Delta rph-1 \Delta aroP \Delta livHMGF \Delta pheP$  ) (BrnQ<sup>+</sup>), (  $\Delta rph-1 \Delta aroP \Delta brnQ \Delta pheP$  ) (LIV-I/LS<sup>+</sup>), および(  $\Delta rph-1 \Delta aroP \Delta brnQ \Delta livHMGF \Delta pheP$  )を作製し活性測定を行った。Fig. 2 (A)より、LIV-I/LSシステムが大腸菌における第三のPhe取り込み系であることが明らかになった。他のPhe取り込み系であるAroP ( )やPheP ( )と比べると、取り込み速度や定常状態における細胞内濃度は低い、Fig. 2 (B)に示すように、これらの菌株をチロシン存在下で培養および活性測定を行った場合には、LIV-I/LSが最も高いPhe取り込み能を示し、生理的に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(A)



(B)

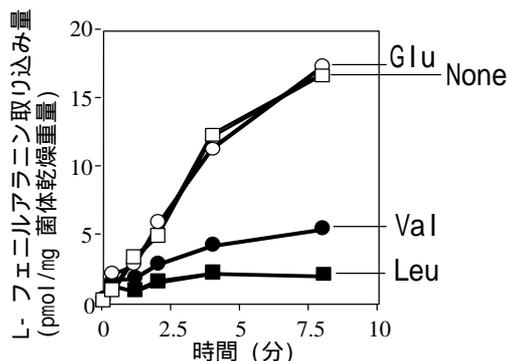
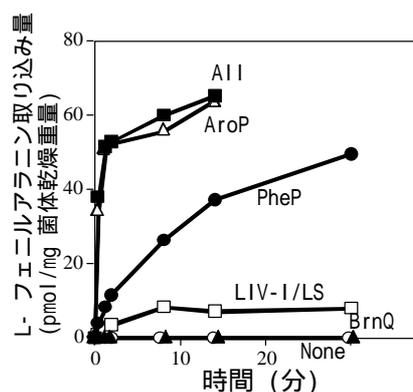


Fig. 1. 分岐鎖アミノ酸による Phe 取り込みの阻害 (A) 1 mM の各アミノ酸溶液を染み込ませたディスクを Phe 含有最少培地上に置き、Phe 要求性/芳香族アミノ酸トランスporter破壊株の懸濁液を重層した。(B)芳香族アミノ酸トランスporter破壊株について、50  $\mu$ M Phe ( )存在下、もしくは5  $\mu$ M Glu ( ), Leu ( ), または Val ( )の共存下でその取り込み能を調べた。

(A)



(B)

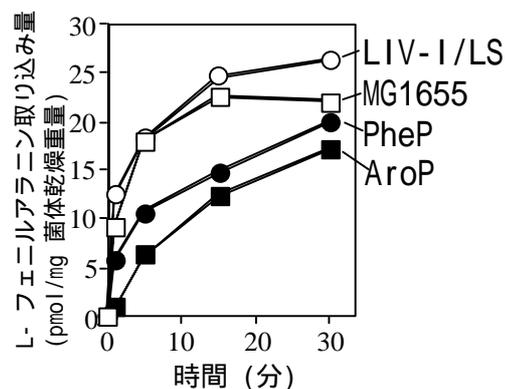


Fig. 2. LIV-I/LSシステムによる Phe の取り込み。(A)AroP-, BrnQ-, LIV-I/LS-, もしくは PheP-発現株による Phe の取り込み。1  $\mu$ M Phe 存在下でアッセイを行った。(B)上記の菌株を 1 mM チロシン存在下で培養後、アッセイを行った。

b) LIV-I/LSシステムは大腸菌のアザセリン感受性に関わる<sup>2)</sup>

アザセリンは放線菌 *S. fragilis* の生産する抗生物質で、原核・真核生物を問わずその成育を阻害する。1980年にWilliamsらによって、大腸菌のアザセリン耐性株においては、Phe 取り込み能が低下するという事実が報告されていた。またアザセリンの毒性は、芳香族アミノ酸、特に Phe や、分岐鎖アミノ酸の培地中への添加によって軽減されるということも報告されていた。芳香族アミノ酸によるアザセリン毒性の緩和について

は、これまでに取得されているアザセリン耐性株がすべて芳香族アミノ酸トランスポーターをコードする *aroP* 遺伝子内に変異をもっていることから、AroP によるアザセリン取り込みの競争阻害の結果であることが明らかにされていたが、どうして Phe が最も軽減効果を示すのか、また分岐鎖アミノ酸がどのように関わっているのかは明らかとされていなかった。

申請者らは、LIV-I/LS システムが分岐鎖アミノ酸のみならず Phe のトランスポーターとしても機能することを見出し、このことは、アザセリン毒性に対する Phe と分岐鎖アミノ酸の軽減効果を同時に説明できることの可能性を示唆していた。

大腸菌 MG1655 株、 $\Delta aroP$  株、 $\Delta liv$  株、および  $\Delta aroP \Delta liv$  二重欠損株を作製し、アザセリン耐性を調べたところ、Fig. 3 (A) に示すように、 $\Delta aroP \Delta liv$  二重欠損株において最も強いアザセリン耐性が見られた。Fig. 3 (B) では、*liv* 遺伝子群をプラスミドを使用して相補させた場合に、 $\Delta aroP \Delta liv$  二重欠損株が再度アザセリン感受性となることを示している。取り込み実験をおこなったところ、アザセリンは Leu および Phe の取り込みを  $K_i = 0.6 \text{ mM}$  で阻害した (data not shown)。以上のことから、LIV-I/LS システムは大腸菌のアザセリン感受性を決定する重要な因子であることが明らかとなった。

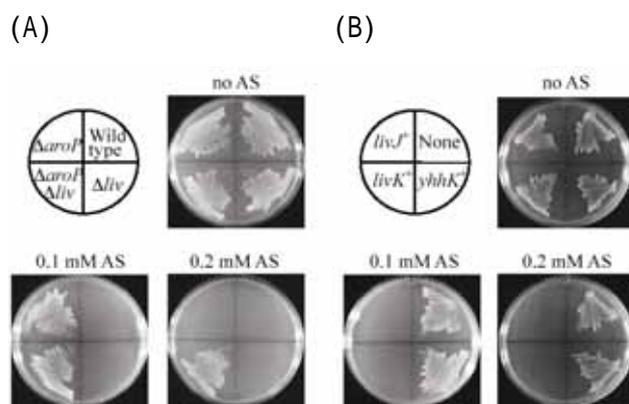


Fig. 3 LIV-I/LSシステムはアザセリン感受性に関与する。(A) MG1655,  $\Delta aroP$ ,  $\Delta liv$ , および  $\Delta aroP \Delta liv$  株をアザセリン (0, 0.1, 0.2 mM) を含む最少培地に画線培養した。(B)  $\Delta aroP \Delta liv$  株を *liv* 遺伝子群を保持するプラスミド (*livJ*<sup>+</sup> および *livK*<sup>+</sup>) で形質転換し、同培地上に画線培養した。

## 2) 転写調節因子 TyrR について

L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) はパーキンソン病の治療薬として使用される芳香族アミノ酸であり、チロシンフェノールリアーゼ (Tpl) の逆反応を利用して合成されている。これまでに申請者らは、*tpl* 遺伝子の転写調節因子として TyrR を同定し、*tpl* 遺伝子上流域におけるその作用機序について検討を加えてきた。TyrR は芳香族アミノ酸代謝にかかわる遺伝子群全般の発現を制御する DNA 結合型の転写調節因子であり、リガンド (ATP と芳香族アミノ酸) と結合してその高次構造を 2 量体から 6 量体へと変化させることで、ターゲット遺伝子の発現を正もしくは負に制御する。Tpl はチロシンによる誘導酵素であるが、*tpl* 遺伝子上流域においても TyrR がチロシンと結

合して6量体を形成することが、転写活性化に不可欠である。このようなTyrRのオリゴマー化プロセスを解明することは、細胞内の芳香族アミノ酸代謝の流れを把握する上で、また将来的には代謝フローを自在に制御する上で極めて重要な意味を持つ。

#### a) オリゴマー化プロセスに関わるアミノ酸残基の同定

Wilsonらは、E275Qアミノ酸置換によってTyrRの6量体化能が著しく低下することを報告している。実際、変異型TyrR<sup>E275Q</sup>では、野生型TyrRと比較して、チロシン誘導時の*tpI*遺伝子の転写活性化能が著しく減少していた (data not shown)。 *tpI*遺伝子の転写活性化能を指標にして、この *tyrR*<sup>E275Q</sup>遺伝子の復帰変異体の取得を試みた。すると、得られた復帰変異型 *tyrR*遺伝子には、ある共通したアミノ酸置換が導入されていた。現在、得られた変異型TyrRについて精製タンパク質を用いた詳細な解析を進めている。

#### b) パーキンソン病治療薬L-DOPA生産への応用<sup>3)</sup>

上記のとおり、*tpI* 遺伝子の転写活性化には、その上流域において TyrR が6量体を形成することが重要である。これまでの研究において、TyrR の6量体化能を促進すると考えられるアミノ酸置換をいくつか同定しており、それらの変異を蓄積することで、さらにTpI発現量の増加した組換え体を作製することを試みた。作製した菌株のL-DOPA生産性を検討したところ、従来と比較して15倍程度の生産性を示し、また誘導物質であるチロシンを添加する必要のない菌株であることが明らかとなった (data not shown)。このことは、転写調節因子を改変することにより目的物質の生産性を高めるという代謝フロー工学の新しいモデルとなるものと考えている。

文献:

1) Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., and Kumagai, H. (2004). Identification of the LIV-I/LS system as the third phenylalanine transporter in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 186(2):343-350.

2) Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., and Kumagai, H. (2004). The LIV-I/LS system as a determinant of azaserine sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters*. 237(1):73-77.

3) Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., and Kumagai, H. (2004). Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. *Journal of Biotechnology*. in press.