

大腸菌のグルタチオントランスポーターに関する研究 ーグルタチオン直接発酵をめざして

鈴木 秀之

(京都大学大学院生命科学研究科)

研究の目的

大腸菌は他の生物と同様、 γ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の働きにより、グルタチオンを生合成する(1)。大腸菌は対数増殖期に菌体外にグルタチオンを排出し、グルタチオン濃度は定常期初期に最大となる(5, 10)。その後、ペリプラズムに局在する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)が、グルタチオンを加水分解してグルタミン酸とシステイニルグリシンを遊離する(7, 10)。これらは、細胞質内に取り込まれてアミノ酸源として利用される(9)。しかし、GGT 欠損株にあっても、長時間培養を続けると菌体外のグルタチオン濃度が徐々にではあるが減少することが明らかとなった。このことから、バクテリアに、これまでに見つかっていないグルタチオントランスポーターがあるのではないかと考えた。

ybiK 遺伝子は *cysB* レギュロンに属し、グルタチオンの輸送あるいは代謝に関与すると報告されていた(6)。しかし、そのメカニズムは不明であった。GenBank は、*yliA*, *B*, *C*, *D* の4つの遺伝子は *ybiK* とオペロンを作っていると予測していた (Figure 1)。また、EcoCys (3)は、YliABCD は ATP-結合カセットスーパーファミリーに属するトランスポーターであり、YliA は ATP-結合コンポーネント、YliB はペリプラズム結合タンパク質、YliC と D は細胞質膜コンポーネントをそれぞれコードしていると予測していた。これらのことから、報告者は、YliABCD はグルタチオントランスポーターをコードしていると考えた。

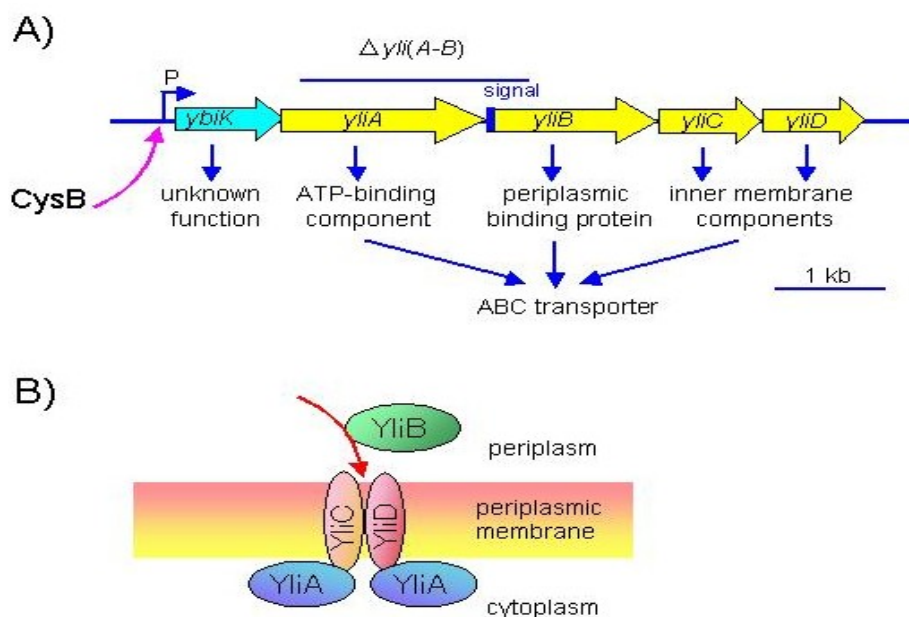


Figure 1. The structure of *ybiK-yliABCD* operon. (A) The order, size and products of the genes, and the location of the promoter suggested by GenBank and EcoCys were diagrammed. The region of DNA deleted in our $\Delta yli(A-B)$ mutation is shown by the bar above the genes. (B) The predicted structure of YliABCD transporter.

方法

グルタチオンの測定 還元型グルタチオン量は Shim-pack Amino-Na カラムを装着した HPLC (model LC-9, Shimadzu)を用いて、蛍光ディテクター(model RF-535)により測定した(8)。なお、試料は、*o*-フタルアルデヒドを検出試薬としてポストカラム法にて修飾した。還元型と酸化型グルタチオンの合計量は Fahey *et al.* (2)らのグルタチオンリダクターゼを用いる方法にて測定した。

トランスポートアッセイ トランスポートアッセイは、 $[^{35}\text{S}]$ グルタチオン（最終濃度 2 nM; 35.4 Tbq/mmol）を用いてすでに報告した方法に準じて行った(4)。但し、M63 培地の代わりにM9 グルコース培地を用いた。ベラパミルやカルボニルシアニド-*m*-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) の影響を測定する際は、グルタチオンを添加する前に、これらの溶液に前もって 37°Cで 30 分間インキュベートした菌体を用いた。

結果

Δggt と $\Delta yli(A-B)$ 変異の菌体外グルタチオン濃度に対する影響 野生型大腸菌は、最大でも数 μM のグルタチオンしか培地中に蓄積しない。このような低濃度のグルタチオン濃度を測定することは難しい。そのため、菌株を *gshA*, *gshB*遺伝子を持つpBR322 (pSH1391)で形質転換してグルタチオン合成系の酵素を高発現させた。菌株間で生育に大きな違いは見られなかった。 Δggt と $\Delta yli(A-B)$ 変異の菌体外グルタチオン濃度に及ぼす影響を調べた(Figure 2)。*ggt*あるいは*yliAB*のいずれかが正常であるとき、グルタチオン濃度は定常期初期に最大となり、その後減少した。一方、 $\Delta ggt \Delta yli(A-B)$ 株の菌体外グルタチオン濃度は、定常期においても緩やかに上昇し続けた。 $\Delta ggt \Delta yli(A-B)$ 株を *ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺D⁺*オペロンを持つpACYC177 で形質転換すると菌体外のグルタチオン濃度は劇的に減少した。

***YliABCD* トランスポーターのトランスポートアッセイ** $[^{35}\text{S}]$ グルタチオンとGGT欠損株を用いてトランスポートアッセイを行った(Figure 3)。 $\Delta yli(A-B)$ 株はグルタチオンを取り込めなかった。一方、*yliA⁺B⁺*株はグルタチオンを取り込んだ。さらに、*ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺D⁺*を持つpACYC177 で、 $\Delta yli(A-B)$ 株を形質転換したところ、グルタチオンを取り込めるようになった。しかし、*ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺*を持つpACYC177 で形質転換した株では、グルタチオンの取り込みは回復しなかった(Figure 3)。

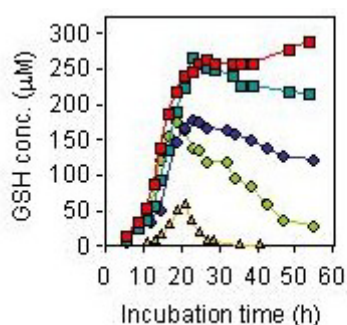


Figure 2. Glutathione concentration of the culture media. Strains SI37 ($\Delta ggt \Delta yli(A-B)$; red square), SI49 (Δggt ; blue square), SH1555 (pACYC177::*ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺D⁺*/ $\Delta ggt \Delta yli(A-B)$; yellow triangle), SI103 ($\Delta yli(A-B)$; blue circle), and SI104 (*ggt⁺ yliA⁺B⁺*; green circle) were grown in 100 ml minimal medium. At the time indicated, 2-ml of culture was subtracted. OD₆₁₀ was measured using 1 ml of the 2 ml-culture. Another 1 ml was centrifuged and the concentration of glutathione of the culture fluid was measured with glutathione reductase.

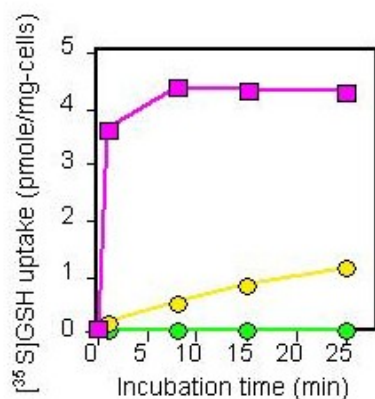


Figure 3. Glutathione uptake in a transporter assay. Strain SI35 ($\Delta ggt \Delta yli(A-B)$; green circles), SH703 (Δggt ; yellow circles), SH1552 (pACYC177::ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺D⁺/ $\Delta ggt \Delta yli(A-B)$; pink squares).

$\Delta yli(A-B)$ 変異の菌体内グルタチオン濃度への影響 上述の菌株をグルタチオン生合成欠損とした変異株($\Delta gshA$)を用いて実験を行った。菌株を 1 mMグルタチオン含有・非含有最少培地で、1 晩生育させた。菌体を超音波処理により破碎後、菌体内のグルタチオン濃度をHPLCにより測定した(Figure 4)。グルタチオンはすべて還元型で存在し、酸化型のものは見つからなかった。グルタチオン非含有培地で菌を培養した場合には、菌体内にグルタチオンはなかった。 $\Delta yli(A-B)$ 変異により菌体内のグルタチオン蓄積量は減少するが、 $\Delta yli(A-B) \Delta ggt \Delta gshA$ (SI100)株の菌体内には無視できない量のグルタチオンが蓄積した。 $\Delta yli(A-B)$ 変異は、ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺D⁺を持つpACYC177 で形質転換すると相補されたが(strain SI154)、ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺を持つpACYC177 では、相補されなかった(strain SI153)。

YliABCD トランスポーターによるグルタチオンの取り込みにはATPase 活性が必要である ATPase 阻害剤ベラパミルが、YliABCD トランスポーターによるグルタチオンの取り込みに及ぼす影響を調べた。YliABCD トランスポーターによるグルタチオンの取り込みは、10 mM のベラパミルにより著しく阻害された(Figure 5)。膜電位阻害剤である CCCP は、100 μ M においても影響がなかった。

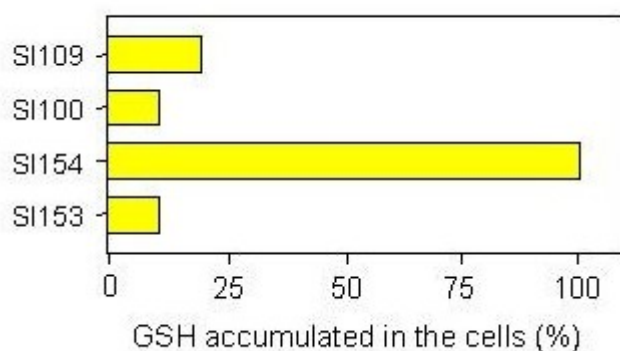


Figure 4. Accumulation of glutathione in the cells grown in minimal medium supplemented with 1 mM glutathione. Strains SI100 (pACYC177/ $\Delta gshA \Delta ggt \Delta yli(A-B)$), SI109 (pACYC177/ $\Delta gshA \Delta ggt$), SI153 (pACYC177::ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺/ $\Delta gshA \Delta ggt \Delta yli(A-B)$), SI154 (pACYC177::ybiK⁺-yliA⁺B⁺C⁺D⁺/ $\Delta gshA \Delta ggt \Delta yli(A-B)$) were grown in minimal medium supplemented with 1 mM reduced glutathione for 12 h. The amount of glutathione found in the cells was expressed as relative to strain SI154. Seventy four nmole of glutathione per mg-cells were found in strain SI154.

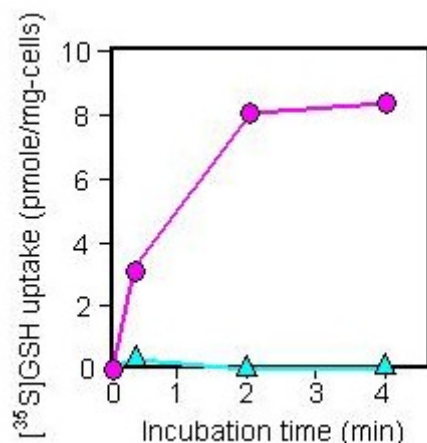


Figure 5. Effect of verapamil on glutathione uptake. Glutathione uptake of strain SH1552 was measured in the absence of verapamil (pink circles), and in the presence of 10 mM verapamil (blue triangles).

***Δyli(A-B)* の菌の生育に及ぼす影響** グルタチオンを唯一S源として菌株が生育するためのYliABCDトランスポーターの能力を調べた。*cysA*遺伝子は硫酸塩パーミアーゼをコードしており、*cysA*変異株は培地中の SO_4^{2-} で生育できない。*cysA Δggt*株は0.3 mMのグルタチオンを唯一S源として含む寒天培地にうっすらとしか生育できない。一方、さらに*Δyli(A-B)*変異を持った株は同じ培地にほとんど生育できない。*cysA*, *cysA Δyli(A-B)*, *cysA Δggt*, *cysA Δyli(A-B) Δggt*株の世代時間は0.3 mMのグルタチオンを含む液体最少培地、37℃で、それぞれ1.7, 2.1, 3.2, and 12時間であった。

結論

以上の結果より、YliABCDはABCトランスポーターを形成しており、YliAはATP結合コンポーネント、YliBはペリプラズム結合タンパク質、YliCとDは膜貫通コンポーネントをコードしていると考えられた。

YliABCDは、大腸菌で見つかった初めてのグルタチオントランスポーターというだけでなく、すべての生物種を通して初めて見つかったABC型のグルタチオンインポーターである。

ホモロジーサーチの結果、*Escherichia coli* O157:H7, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serovar Typhi と *Salmonella enterica* serovar Typhimurium に YliABCD のホモログがあることが分かった。ABC型グルタチオンインポーターが発見されたことから、グルタチオンの膜輸送の機構はこれまで考えられていた以上に多様であると考えられた。

文献

1. P. Apontoweil and W. Berends. 1975. Glutathione biosynthesis in *Escherichia coli* K12. Properties of the enzymes and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **399**:1-9
2. R. C. Fahey, S. Brody, and S. D. Mikolajczyk. 1975. Changes in the glutathione thiol-disulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *J. Bacteriol.* **121**:144-151.
3. P. D. Karp, M. Arnaud, J. Collado-Vides, J. Ingraham, I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr. 2004. The *E. coli* EcoCyc database: no longer just a metabolic pathway database. *ASM News* **70**:25-30.

4. T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki, and H. Kumagai. 2004. Identification of the LIV-I/LS system as the third phenylalanine transporter in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **186**:343-350.
5. R. A. Owens and P. E. Hartman. 1986. Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol. **168**:109-114.
6. J. Parry and D. P. Clark. 2002. Identification of a CysB-regulated gene involved in glutathione transport in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **209**:81-85.
7. H. Suzuki, W. Hashimoto, and H. Kumagai. 1993. *Escherichia coli* K-12 can utilize an exogenous γ -glutamyl peptide as an amino acid source, for which γ -glutamyltranspeptidase is essential. J. Bacteriol. **175**:6038-6040.
8. H. Suzuki, S. Izuka, H. Minami, N. Miyakawa, S. Ishihara, and H. Kumagai. 2003. Use of bacterial γ -glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of γ -D-glutamyl compounds. Appl. Environ. Microbiol. **69**:6399-6404.
9. H. Suzuki, S. Kamatani, E.-S. Kim, and H. Kumagai. 2001. Aminopeptidases A, B and N, and dipeptidase D are the four cysteinylglycinases of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **183**:1489-1490.
10. H. Suzuki, H. Kumagai, and T. Tochikura. 1987. Isolation, genetic mapping and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants lacking γ -glutamyltranspeptidase. J. Bacteriol. **169**:3926-3931.