

発酵生産の飛躍的増強を目指す輸送体分子制御技術基盤の創成

阿部 敬悦

(東北大学大学院 農学研究科)

研究の目的

微生物発酵(アミノ酸・核酸)は細胞内代謝の強化改変により成功を収めたが、現在では基質輸送・産物排出が律速である。産業菌のグルタミン酸排出系が遺伝学的に同定されたのですら最近であり¹⁾、生化学的解析例は極めて少ない。遺伝子が輸送体をコードすると推定されても、遺伝学及び生化学的解析無しには輸送基質の推定は殆ど出来ない²⁾。膜蛋白質である輸送体は生化学的取扱いが困難で、結晶解析も20例以下である。

国内外共に、輸送能強化による生産性の限界打破が重要課題となるが、輸送体生化学情報不足から、輸送体本体を改変制御して物質生産を行う技術は実現していない。

一般に物質の輸送過程はエネルギーを消費することから、我々は、発酵生産に極めて有効な輸送体として、輸送過程でエネルギーを消費せずにエネルギーを生産しつつ物質生産を高効率に行う反応と輸送体の探索を行い、L-アスパラギン酸(Asp):L-アラニン(Ala)変換系^{3,4)}を世界で初めて発見し、生化学解析から産業応用を行ってきた(図1)⁵⁾。

本反応は、基質(Asp):産物(Ala)交換輸送体 AspT により触媒される。AspT は最速の輸送体に属し、高効率反応の中核を成す⁵⁾。我々は工業用 Asp:Ala 変換乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の AspT を単離し⁶⁾、生化学的構造解析から、膜貫通領域(10回貫通型)・輸送体初の輸送制御領域(TrkA_C ドメイン)⁶⁾、基質透過膜貫通領域 TMIII⁷⁾を同定した(図2)。微生物発酵生産では、細胞内外の基質・産物の取り込み排出制御が残された大きな未開拓領域である。本研究課題では、輸送体の基質特異性及び輸送の方向性(取り込み・排出)を制御する新技術を開発するために、AspT をモデルに、AspT の基質特異性の解析と基質結合部位の同定を行った。

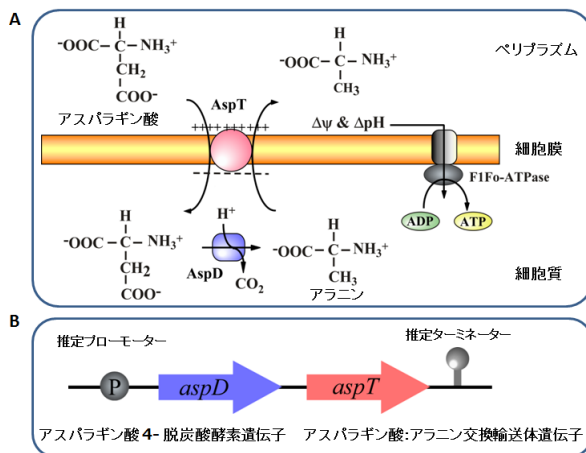


図1. A:アスパラギン酸の脱炭酸反応に共役したエネルギー生成(Asp:Ala変換型脱炭酸的リン酸化反応) B:*T. halophilus*のaspオペロンの遺伝子構造

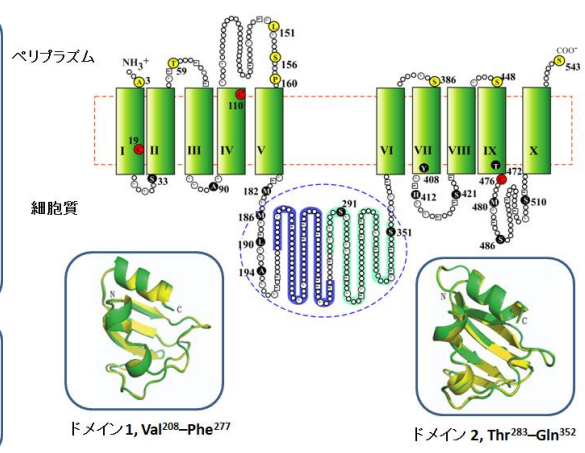


図2. Cysteine scanning法によるAspTの二次構造モデルと親水性ループ領域のモデリング構造

方法

AspT の精製：AspT は N-末または AspT 中央の cytoplasm 側 big-loop に His-tag(HisX6) を付加したもの(AspT-His6)を大腸菌で発現して用いた。AspT-His6 発現大腸菌をフレンチプレスにて破碎し、超遠心にて膜画分を回収した。膜画分より界面活性剤ドデシルマルトシド(DDM)で可溶化した AspT-His6 を Ni-NTA カラムにて精製した⁸⁾。

AspT の輸送解析⁸⁾：精製 AspT-His6 は、超音波で分散させた大腸菌 lipid と界面活性剤オクチルβ-グルコシド(OG)に可溶化後、可溶化液を基質封入緩衝液(100 mM の封入基質 Asp または Ala と 100 mM カリウムリン酸緩衝液[pH7])に希釈することで、AspT-His6 の再構成された proteoliposome を作製した。proteoliposome は超遠心にて回収し、輸送反応解析緩衝液(100mM K₂SO₄, 100 mM カリウムリン酸緩衝液 [pH7])にケン濁した。輸送反応は、放射性標識された Asp または Ala を proteoliposome 外部に終濃度 0.1mM になるように添加して行った。基質特異性解析では、輸送反応開始時に競合基質を 15mM 加えて輸送阻害を解析した。また Asp および Ala の輸送反応が定常状態に達した時に、競合基質を加え proteoliposome からの放射性 Asp または Ala の排出を確認した。

結果

AspT の Kinetics 解析

L-Asp, L-Ala の他にも、基質特異性解析の結果、AspT に基質として認識されることが判明したD-Asp, D-Ala, L-Ser, L-Cys について自己交換反応条件での kinetics 解析を行った(表 1)。K_m はそれぞれ、0.35 mM (L-Asp), 26 mM (L-Ala), 0.098 mM (D-Asp), 3.3 mM (D-Ala), 8.2 mM (L-Cys), 11 mM (L-Ser) となった。V_{max} は 175 μmol/min/mg protein (L-Asp), 155 μmol/min/mg protein (L-Ala), 3.8 μmol/min/mg protein (D-Asp), 3.3 μmol/min/mg protein (D-Ala), 11 μmol/min/mg protein (L-Cys), 103 μmol/min/mg protein (L-Ser) となった。V_{max}/K_m を比較すると、最も高いのが 500 (L-Asp) で、次が 39 (D-Asp), 9.5 (L-serine), 6.0 (L-Ala), 1.3 (L-Cys), 1.0 (D-Ala) であった。L-Ser, L-Cys も AspT の基質となることが明らかとなり、親和性は L-Ala よりも高かった。kinetics 解析の結果、AspT への親和性は Asp, Ala とともに L 体よりも D 体の方が高かったが、V_{max} は D 体が L 体よりも遅く、D体がAspTより遊離し難いことが示唆された。

表 1. アスパラギン酸およびアラニン異性体の AspT に対するキネティックパラメーター

| | K _m [mM] | V _{max} [μmol/min/mg protein] | V _{max} /K _m |
|-------|------------------------|---|----------------------------------|
| L-Asp | 0.35 ± 0.03 | 175 ± 21 | 500 |
| L-Ala | 26 ± 2 | 155 ± 9 | 6.0 |
| D-Asp | 0.098 ± 0.000 | 3.8 ± 0.3 | 39 |
| D-Ala | 3.3 ± 0.2 | 3.3 ± 0.4 | 1.0 |

競合阻害を用いた AspT の基質特異性解析

L-Asp 自己交換反応, L-Ala 自己交換反応に対して、各アミノ酸を 15 mM になるように添加した場合の $^3\text{H-Asp}$, $^3\text{H-Ala}$ の proteoliposome 内への取り込み量の変化を比較した。1/10 V_{\max} となるように L-Asp 自己交換反応、L-Ala 自己交換反応の外部基質濃度を調整した。アミノ酸を添加しなかった場合の輸送速度を 100% とした。その結果、L-Asp 自己交換反応に対して添加した際に L-Asp 輸送活性を 80% 以下まで阻害したのは、D-Asp, L-Asp, L-Asn, L-Cys, L-Glu, L-Trp であった。一方、L-Ala 自己交換反応に対して添加した場合に、L-Ala 輸送活性を 80% 以下に阻害したのは、D-Asp, L-Asp, L-Ser, L-Asn, L-Ala, L-Met, L-Thr, D-Ser, L-Arg, L-Leu, L-Phe, D-cycloserine, β -Ala であった。これらの物質の中でも D-Asp, L-Asp, L-Asn, L-Cys, L-Glu は L-Asp 自己交換反応をより強く阻害した。一方、L-Ser, L-Ala, L-Met, L-Thr, D-Ser, L-Arg, L-Leu, β -Ala は L-Ala 自己交換反応をより強く阻害した。特に L-Cys に注目すると、L-Asp 自己交換では 28% まで阻害したが、L-Ala 自己交換はほぼ阻害しなかった。L-Ser の場合は反対に L-Asp 自己交換反応は阻害せず、L-Ala 自己交換反応を 42% まで阻害した。つまり、L-Asp 自己交換反応と L-Ala 自己交換反応とでより強く阻害する物質の種類が異なった。以下で更に K_i 値を詳細に解析する。

L-Cys, L-Ser および Asp アナログによる AspT 阻害と基質結合部位の推定

L-Asp 自己交換反応 (外部 L-Asp : 0.35 mM)、L-Ala 自己交換反応 (外部 L-Ala : 26 mM) に対する L-Cys, L-Ser および Asp のアナログである L-cysteine sulfinic acid (L-CSA), L-cysteic acid (L-CA), D-cysteic acid (D-CA) の阻害定数を Dixon plot 解析にて求めた(表2)。Dixon plot より求めた L-Asp 自己交換反応に対する K_i 値は 0.59 ± 0.08 mM (L-CSA), 0.29 ± 0.05 mM (L-CA), 0.14 ± 0.02 (D-CA), 2.0 ± 0.2 (L-Cys), 阻害無し(L-Ser) であった。L-Ala 自己交換反応に対する K_i 値は 28 ± 0 mM (L-CSA), 14 ± 0 mM (L-CA), 5.0 ± 0.2 mM (D-CA), 5.3 ± 1.7 mM (L-Ser), 20 ± 2.7 mM (L-Cys) であった。L-Asp 自己交換反応に対しては、D-CA, L-CA, L-CSA, L-Cys の順に阻害したが、L-Ala 自己交換反応の場合は D-CA, L-CA, L-CSA, L-Ser の順に阻害した。Dixon plot より阻害様式は競合阻害であった。すなわち L-Cys と L-Asp のアナログは L-Asp の輸送を選択的に阻害したが、L-Ala 輸送への阻害は弱く、一方、L-Ser は L-Ala 輸送を阻害したが L-Asp 輸送を阻害しなかった。以上の結果は、AspT の L-Asp 結合部位と L-Ala 結合部位が独立して存在することを示している。

表 2. L-Cys, L-Ser, L-Asp アナログの AspT に対する K_i 値

| | L-Asp self-exchange | | L-Ala self-exchange | |
|------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| | K_i [mM] | IC_{50} [mM] | K_i [mM] | IC_{50} [mM] |
| L-cysteine | 2.0 ± 0.2 | 8.9 | 20 ± 2.7 | 65 |
| L-serine | N.D.* | N.D.* | 5.3 ± 1.7 | 28 |
| L-CSA | 0.59 ± 0.08 | 0.83 | 28 ± 0 | 28 |
| L-CA | 0.29 ± 0.05 | 0.47 | 14 ± 0 | 16 |
| D-CA | 0.14 ± 0.02 | 0.19 | 5.0 ± 0.2 | 9.0 |

* N.D.: L-Ser の L-Asp 輸送に対する K_i 値 は大きすぎて決定できなかった。

結論

AspT His-tag 体を精製後、proteoliposome に再構成して輸送過程の kinetics 解析を行った。その結果、AspT では、L-Asp の結合部位と L-Ala 結合部位が独立して存在することが明らかとなった。現在 TM3 を L-Asp 結合部位として解析している。

文献

- 1) Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H., and Wachi, M. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4491-4498
- 2) Barabote, R. D., Tamang, D. G., Abeywardena, S. N., Fallah, N. S., Fu, J. Y., Liop, J. K., Mirhosseini, P., Pezeshk, R., Podell, S., Salampeyy, M. L., Thever, M. D., and Saier, M. H., Jr. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1557-1579
- 3) Abe, K., Hayashi, H., and Maloney, P. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 3079-3084
- 4) Abe, K., Ohnishi, F., Yagi, K., Nakajima, T., Higuchi, T., Sano, M., Machida, M., Sarker, R. I., and Maloney, P. C. (2002) *J. Bacteriol.* **184**: 2906-2913
- 5) 七谷圭, 阿部敬悦 (2008) *バイオインターストリーとバイオサイエンス* **66**: 442-446
- 6) Nanatani, K., Fujiki, T., Kanou, K., Takeda-Shitaka, M., Umeyama, H., Wang, X., Nakajima, T., Uchida, T., Maloney, P. C., and Abe, K. (2007) *J. Bacteriol.* **189**: 7089-7097
- 7) Nanatani, K., Maloney, P. C., and Abe, K. (2009) *J. Bacteriol.* **191**: 2122-2132
- 8) Sasahara, A., Nanatani, K., Enomoto, M., Kuwahara, S., and Abe, K. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**: 29044-29052