

Paracoccus sp. 43P 株の L-glucose 代謝機構の解析

中村 顕

(筑波大学大学院 生命環境科学研究科)

研究の目的

地球上のほぼすべての生物は、D-glucose (D-glc)を炭素源及びエネルギー源として利用し、生活している。また、D-glc の代謝経路に関しても、解糖系やペントースリン酸経路などその詳細が明らかになっている。ところが D-glc の鏡像体の L-glc に関しては、自然界での存在は確認されていない上、L-glc を資化する生物も知られていない。むしろ Rudney が¹⁾、1940 年に哺乳類・酵母・いくつかのバクテリアは L-glc を資化しないと報告して以来、生物は L-glc を資化しないものと捉えられている。このため、タンパク質合成に L-アミノ酸のみが利用されるように、地球上の生物は糖質の資化、特にグルコースの資化に関して、“ホモキラリティー”を有していると捉える事ができる。

我々はこの“糖質資化のホモキラリティー”の問題にチャレンジするために、自然界から L-glc 資化能を有する微生物のスクリーニングを行い、*Paracoccus* sp. 43P 株を得た。同株の L-glc 代謝経路について検討したところ、初発反応が L-glc dehydrogenase (L-GDH) による NAD⁺ 依存的な酸化反応であることを明らかにした。本研究では、L-GDH 以降の L-glc 代謝に関わる酵素・遺伝子の同定を行い、同株の L-glc 代謝機構の全貌を明らかにすることを目指した。

方法

L-GDH 遺伝子 (*lgdA*) 周辺領域の解析

既にクローン化した *lgdA* の周辺領域を解析するため、43P 株のゲノム DNA を鋳型として、primer walking 法により PCR 増幅を行い、塩基配列解析を行った。

各遺伝子の⁺大腸菌を宿主とした異種発現及び酵素精製

上記で同定した L-GDH、L-GnDH 及びその周辺遺伝子の ORF を pET21a または pET28a にクローン化し、大腸菌 BL21(DE3) 株を宿主として、C 末端または N 末端に His-tag を付加する形で発現させた。さらに常法に従って His-tag に対する affinity を用いて各酵素の精製を行った。

各酵素の酵素活性の同定

各精製酵素を用いて、予想される酵素活性の検出を行った。基質には市販の糖・アルドロン酸類またはそれらを化学反応及び酵素反応により変換した化合物を用い、反応条件及び活性検出には各酵素に適した方法で行った。

酵素反応生成物の同定

一部の酵素反応生成物に関しては、TLC を用いた精製後、HPLC 解析、GC/MS 解析、あるいは ¹H-NMR による水素原子の帰属解析を行うことによって、同定を行った。

ORFを見出し、これらのORFはPD1222株の該当遺伝子(Pden_4923-Pden_4932)とアミノ酸配列レベルでそれぞれ71-91%の相同性を示した。これらの遺伝子産物はアルドースの1位が酸化されて生じるアルドン酸代謝に関連することが推定されたので、これらの遺伝子がL-gluconate以降の代謝に関連するものと推定し、*lgnR*及び*lgnA-I*と命名した(Fig. 2)。これらの遺伝子のうち*lgnE-I*が代謝関連酵素をコードすると推定されたので、以降の解析を行った。

3) L-gluconate 以降の代謝経路の解析

以上を踏まえて、LgnE-IがL-gluconate以降の代謝に関与するのかどうかを明らかにするため、大腸菌を宿主として各酵素を生産・精製し、各酵素活性について以下のように検討を加えた。

LgnH (L-GnDH)

LgnHは、予想通り精製L-GnDHと同様の活性を示した。本酵素はL-gluconate以外に、L-gluconateのC4 epimerのL-galactonateにも活性を示したが、C2 epimerおよびC5 epimerのL-mannonate、D-idonateに対しては活性を示さなかった。本酵素のL-gluconateを基質とした反応産物は、HPLC分析により5-keto-L-gluconateと同定されたので、LgnHはL-gluconateの5位の炭素を酸化する酵素であることが判明した。

LgnI (D-idonate dehydrogenase/5-keto-L-gluconate reductase)

LgnIは、D-idonateに対してNADP⁺依存的なdehydrogenase活性を示し、またLgnH反応産物である5-keto-L-gluconateに対してreductase活性を示した。反応平衡はreductase側に大きく偏っており、生理的にはreductaseとして機能するものと考えられる。そのためL-glc代謝経路では、LgnH/LgnIによる酸化/還元反応を通じて、L-gluconateからD-idonateへとD/L変換を行うものと結論した。

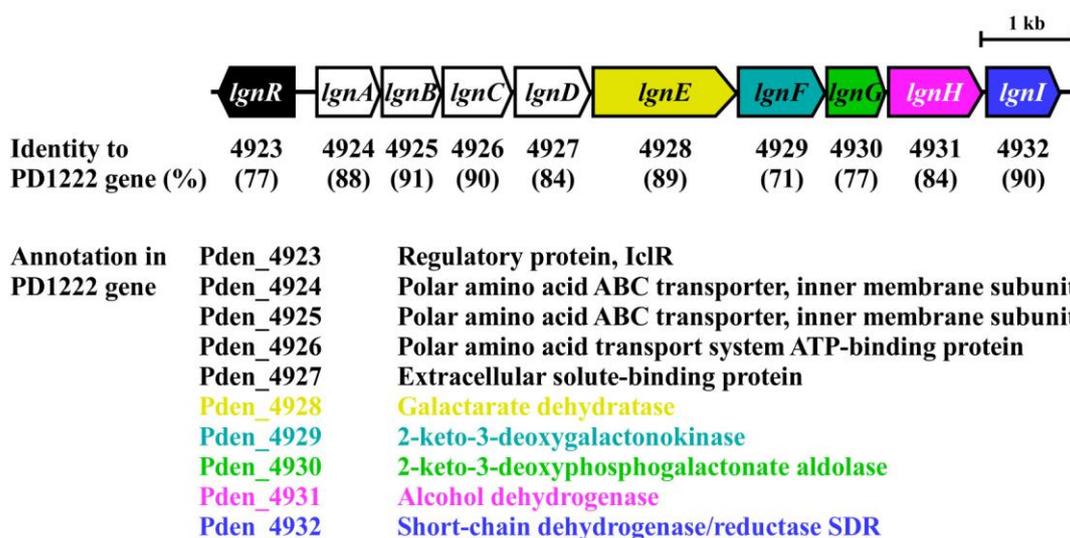


Fig. 2. Gene organization of the *lgn* cluster of strain 43P.

The ORFs of the *lgn* cluster are shown with boxes, and the amino acid sequence identity of each ORF with the corresponding gene from strain PD1222 is indicated. Annotations for PD1222 genes were cited from the KEGG database.

LgnE (D-idonate dehydratase)

LgnE は一般的な dehydratase と同様、 Fe^{2+} と DTT の存在下で D-idonate を還元性の化合物へと変換する活性を有していることを TLC により示した。また、反応生成物は HPLC 及び NMR 解析により 2-keto-3-deoxy-D-galactonate (KDGal) と同定されたので、LgnE は D-idonate の 2, 3 位の炭素原子から水分子を引き抜く D-idonate dehydratase であることが明らかになった。

LgnF (KDGal kinase) と LgnG (phospho-KDGal aldolase)

LgnF 及び LgnG の PD1222 株のオルソログ(それぞれ Pden_4929 及び Pden_4930 遺伝子産物) は、それぞれ KDGal kinase、6-phospho-KDGal (PKDGal) aldolase とアノテートされていたので、該当する活性について検討した。LgnF は ATP 存在下で KDGal を他の化合物へと変換する活性を有していることが TLC により示された。さらにこの反応系に LgnG を添加して反応させた後、その反応液を基質に市販の lactate dehydrogenase、3-phospho-glyceraldehyde (G3P) dehydrogenase をそれぞれ反応させると、顕著な活性が検出されたことから、LgnG 反応により pyruvate と G3P が生じたことが示された。従って、LgnF が KDGal の 6 位をリン酸化し、LgnG が PKDGal を pyruvate と G3P に解裂させることが明らかになった。

結論

上記の解析により明らかになった、*Paracoccus* sp. 43P 株の L-glc 代謝経路のモデルを Fig. 3 に示す。一般に、アルドース糖の C1 位を酸化してアルドン酸へと変換し、さらに dehydratase、aldolase 反応により TCA 回路基質である C3 unit へと代謝する経路は、Entner-Doudoroff (ED) 経路と総称される。本代謝経路は、基質のリン酸化が起こるタイミングから、semi-phosphorylative (semi-P) ED 経路に分類されるが、従来知られている

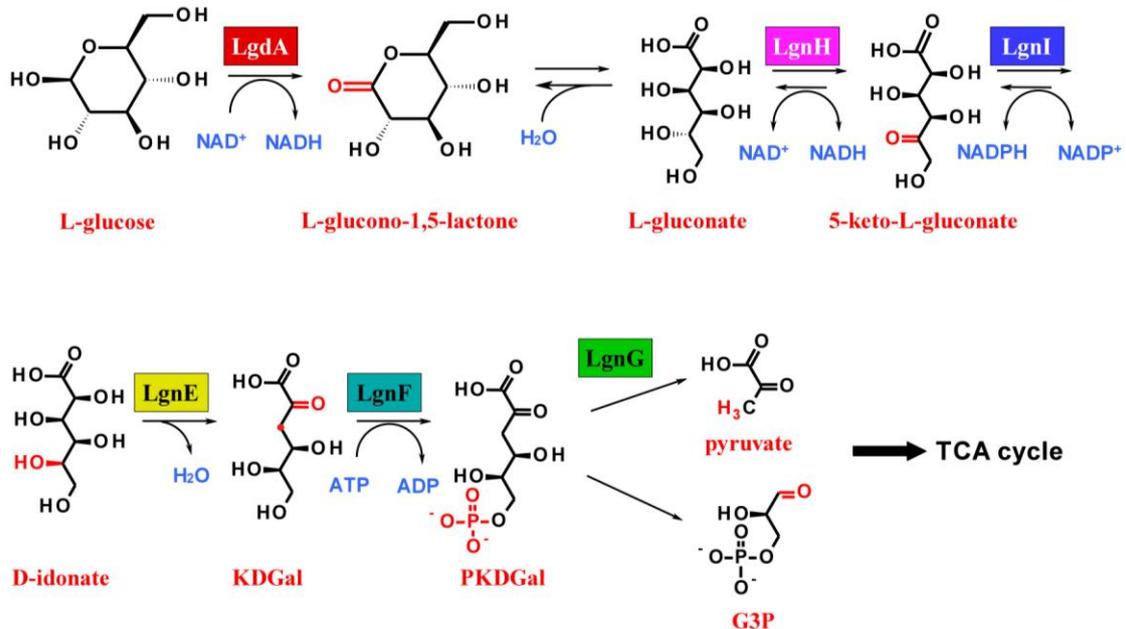


Fig. 3. Model of L-glucose metabolic pathway in strain 43P.

The compounds and the enzymes in this pathway are shown, and the atoms and bonds altered by each enzyme reaction are indicated by red color.

semi-P ED 経路は超好熱性古細菌の D-glc 代謝でのみ認められる²⁾。これと比較すると、本代謝経路はアルドン酸の C5 位の酸化/還元を通じて D/L 変換を行う点が特徴的である。また、本代謝経路の L-gluconate 以降のステップは、大腸菌 L-galactonate 代謝経路³⁾と起こる反応は同一であるが、大腸菌の代謝酵素との間の相同性はほとんど認められない。従って本代謝経路は、L-glc を出発基質とする点に加えて、非常にユニークなものであると考えられる。

文献

1. Rudney, H. (1940) The utilization of L-glucose by mammalian tissues and bacteria. *Science* **92**: 112-113
2. Ahmed, H., Ettema, T. J. G., Tjaden, B., Geerling, A. C. M., van der Oost, J., and Siebers, B. (2005) The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. *Biochem. J.* **390**: 529-540
3. Cooper, R. A. (1979) The pathway for L-galactonate catabolism in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **103**: 216-220