

有機酸発酵生産の効率化へ向けた AAEx トランスポーターの基質輸送メカニズムの解明

七谷 圭

東北大学大学院 農学研究科

研究の目的

有機酸は高分子素材の原料となるため、現在は主に原油を原料にして生産されている。グリーンバイオテクノロジーの普及に伴い、微生物を用いた有機酸生産に向けて様々な研究開発が進められている。しかしながら、有機酸は極性が高いため、細胞を覆うリン脂質膜を透過することができず、有機酸の菌体外への排出には化合物を通す輸送担体（トランスポーター）が必要である。本研究は有機酸排出機能強化を目的とし、有機酸の細胞外への排出を担うトランスポーターの構造と有機酸排出メカニズムの解明を目指し、下記3つの課題に取り組んだ。

・課題1 AAEx トランスポーターの結晶構造解析

【方法】膜タンパク質の結晶構造解析には、安定性の高いホモログ遺伝子の取得が不可欠である。そこで、AAEx トランスポーターホモログ遺伝子をクローニングし発現を試みた。また、AAEx トランスポーターの精製方法の検討と結晶化条件の検討を行った。

【結果】AAEx トランスポーターの発現と精製に成功した。現在、精製タンパク質を用いて結晶化条件の探索を進めている。

・課題2 AAEx トランスポーターの *in vivo* 機能解析手法の確立

【方法】AAEx トランスポーターの機能メカニズムを解析するため、モデルとして

Tetragenococcus halophilus 由来の

アスパラギン酸：アラニン交換輸送体（AspT）¹⁾ を選抜した。

AspT の Ala 排出機能を効率的に進める方法を確認するため、大腸菌アラニン排出輸送体欠損株（MLA301 Δ ylaW）²⁾ を用いた。

MLA301 Δ ylaW 株は、Ala 排出機能を欠損しているため、Ala-Ala 含有培地において菌体内に過剰な Ala が蓄積し生育阻害が引き起こされる。この株の特性を利

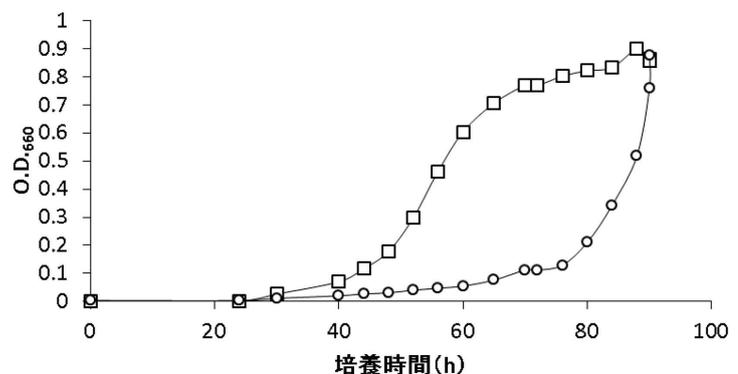


図 AspT の Ala 排出による Ala-Ala 耐性の回復
Ala-Ala 感受性 MLA301 Δ ylaW 株を pTrc_aspT (□)、pTrc99A (○) で形質転換し、Ala-Ala 0.5 mM を含んだ最少培地で培養した。

用して、AspT の Ala 排出機能による生育の回復を調べることにより、AspT の機能を解析する系の構築を試みた。

【結果】はじめに、*E. coli* MLA301ΔygaW 株を L-Ala-L-Ala 含有培地で生育させ、培養温度、IPTG 濃度、培養時間等の条件を最適化した。最適条件下において、L-Ala-L-Ala による生育阻害が AspT の発現により回復することを観察した (図)。本手法は、簡便に輸送反応を調べることができることから AAEx トランスポーターの機能解析に有効である。

・課題3 *in vitro* 機能解析に向けた安定的なプロテオリポソーム調製方法の確立

【方法】トランスポーターの機能の詳細な解析には、安定なリポソームの作製が不可欠である。従来のリポソーム作製方法では、輸送活性を測定する際にリポソームが不安定化してしまうため長時間の活性測定が困難であった。そこで、不安定性の原因が残存する界面活性剤の影響であると推察し、リポソーム作成時に界面活性剤を吸着するバイオビーズを添加することにより、安定なリポソームの構築を試みた。

【結果】バイオビーズを用いたプロテオリポソームの作製条件を最適化し、安定なリポソームの作製に成功した。このリポソームを用いることにより長時間の解析が可能となった。本手法は、AAEx トランスポーターの詳細な機能の解析に有効である。

結論

有機酸発酵生産の効率化へ向けた AAEx トランスポーターの基質輸送メカニズムの解明に向けて、AAEx トランスポーターの発現と精製系の構築に成功し、構造解明に向けて前進した。また、効率的に機能を解析する手法を確立し、機能の詳細な解析に向けた実験手法の確立を行った。

文献

- 1) Sasahara, A., Nanatani, K., Enomoto, M., Kuwahara, S., Abe, K. (2011) Substrate specificity of the aspartate:alanine antiporter (AspT) of *Tetragenococcus halophilus* in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.*, **286**: 29044-29052.
- 2) Hori, H., Yoneyama, H., Tobe, R., Ando, T., Isogai, E., Katsumata, R. (2011) Inducible L-alanine exporter encoded by the novel gene ygaW (*alaE*) in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, **77**:4027-4034.