

# *Cupriavidus* sp. LA-1 株のプテリン分解遺伝子の 発現制御機構の解明と応用

土肥 裕希  
筑波大学 生命環境系

## 研究の目的

プテリン化合物は、色素や補酵素の構成骨格として自然環境中に広く存在する。我々によって単離された *Cupriavidus* sp. LA-1 株は、7-ヒドロキシプテリン (7-HP) やデアミノプテリン (=ルマジン) を唯一の炭素源として生育可能な細菌であり、それらの分解に関与する遺伝子クラスターの発現は基質誘導性であった。本研究では、当該遺伝子クラスターの発現を調節する転写制御因子の制御機構を明らかにすると共に、細胞内のプテリン分解酵素を用いた希少化合物の酵素生産を目的とした。

## 方法

### 1. 使用菌株と培養

7-HP/ルマジン分解菌 *Cupriavidus* sp. LA-1 株を使用した。LB 液体培地で培養した LA-1 株を 0.1% yeast extract を含む改変 M9 液体培地 (10 mM  $K_2HPO_4$ , 10 mM KCl, 20 mM  $NH_4Cl$ , 10 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1% Hunter's trace elements, pH 7.5) に植菌し、28°C で一晩振盪培養した。菌体を遠心分離によって集菌し、滅菌した生理食塩水で洗浄・懸濁したものを各培地に接種した。大腸菌の培養には LB 培地を使用した。

### 2. 組換え酵素の発現と精製

LA-1 株の全 DNA を鋳型に用いて、PCR によって *orf\_3* および *orf\_9* 遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を制限酵素で処理した後、発現プラスミド pET21a(+) または pET28a(+) (Merck Millipore) に挿入し、これを大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換した。プロトコールに従って目的タンパク質を発現させた後、回収した菌体を超音波処理 (20 W, 1 min, 5 cycles) によって破碎し、遠心分離後の上清を 0.22  $\mu m$  シリンジフィルターに供して無細胞抽出液を調製した。組換えタンパク質の精製には HisTrap FF カラム (Cytiva) を使用した。プロトコールに従って精製した組換えタンパク質を Amicon Ultra-15 10K (Merck Millipore) に供して脱塩した後、使用するまで -80°C に保管した。精製したタンパク質の確認は、SDS-PAGE によって行った。

### 3. LA-1 株の遺伝子破壊株の作製

*orf\_3* および *orf\_9* 遺伝子の破壊は相同組換え法を用いて行った。目的遺伝子とその周辺を含む約 3 kb を PCR によって増幅し、pUC19 (Takara Bio Inc.) にクローニングした。作製したプラスミド上の目的遺伝子の内部に制限酵素を用いて pNSGroE (GenBank: AY576605) 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入した後、それらをエレクトロポレーション法 (1.6 kV, 5 ms) によって LA-1 株に導入した。クロラ

ムフェニコールを添加した平板培地を用いて形質転換体を選択した後、それらの遺伝子破壊の成否を PCR によって確認した。

#### 4. 遺伝子の発現解析 (qRT-PCR)

LA-1 株の全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) と RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) を用いてそれぞれ抽出した後、これらを鋳型にして QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA を合成した。各遺伝子の発現は、cDNA (鋳型)、各遺伝子に特異的なプライマー、SYBR™ Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (Toyobo Co., Ltd) を用いて Light Cycler® 96 system (Roche Diagnostics) によって解析した。各遺伝子の発現量 (Cq 値) は、16S rRNA 遺伝子の発現量を用いて基準化した。

#### 5. その他

LA-1 株の代謝産物や酵素の反応産物は HPLC (Agilent 1200 Infinity, Agilent Technologies) を用いて検出・定量し、分析カラムには TSKgel ODS-120H (Tosoh Co.) を用いた。LA-1 株の無細胞抽出液の調製は、大腸菌と同様の方法で行った。

### 結果

#### 1. プテリン分解遺伝子クラスターの発現

LA-1 株は、7-HP をプテリン分解遺伝子クラスターにコードされた酵素タンパク質によってキサンチン (XA) を経て分解資化する (Fig. 1)。orf\_1 と orf\_2 の発現は 7-ヒドロキシルマジン (7-HL, 7-HP の脱アミノ体) よりも 7-HP で強く誘導されたことから、推定オペロン①はプテリン構造体によって発現が誘導されることが示唆された。一方、推定オペロン②および③の発現は、7-HP よりも 7-HL でより強く誘導された。このことから、推定オペロン①の発現を制御している転写制御因子 (TR) はプテリン構造に、推定オペロン②および③の発現を制御している TR はルマジン構造に応答することが示唆された。

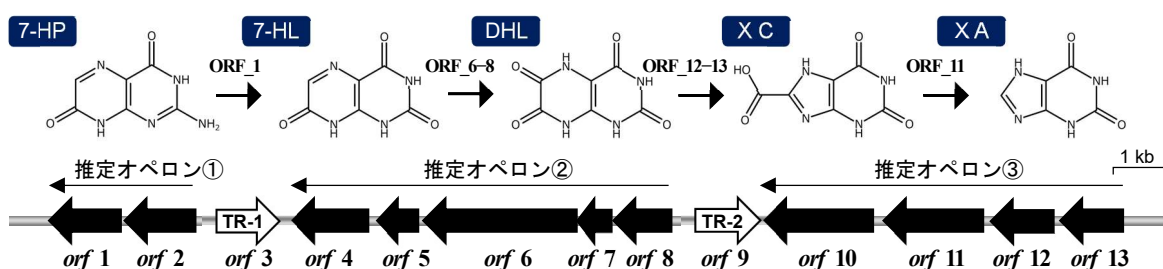


Fig. 1 *Cupriavidus* sp. LA-1 株の 7-HP 分解とプテリン分解遺伝子クラスターの構造.

#### 2. 転写制御因子が制御する遺伝子群

LA-1 株のプテリン分解遺伝子クラスターには、転写制御因子をコードした遺伝子が 2 つ含まれる (orf\_3=TR-1、orf\_9=TR-2)。遺伝子構造と発現解析の結果から、TR-

1 は推定オペロン①を、TR-2 は推定オペロン②および③の発現を制御していると考えられた。TR-1 および TR-2 の基質認識機構すなわち基質との結合性を評価するため、これら TR の組換えタンパク質を調製したが、いずれも安定性が著しく低く、組換えタンパク質を用いた解析は困難であった。

そこで、TR-1 遺伝子 (*orf\_3*) および TR-2 遺伝子 (*orf\_9*) の破壊を試みた結果、TR-2 遺伝子破壊株 ( $\Delta$ TR-2 株) の作製に成功した。 $\Delta$ TR-2 株は 7-HP を脱アミノして 7-HL を産生したが、その 7-HL あるいは添加した 7-HL を分解・資化することはできなかった。このことから、TR-2 は 7-HL 分解に必要な推定オペロン②および③の発現を制御していることが示された。

### 3. プテリン分解酵素を用いたキサンチン-8-カルボン酸の酵素生産

TR-2 の制御下にある推定オペロン③の *orf\_12* と *orf\_13* にコードされているタンパク質から成る酵素複合体 (ORF12-13) は、6,7-ジヒドロキシルマジン (DHL) をキサンチン-8-カルボン酸 (XC) に変換する (Fig. 1)。7-HP、7-HL、ルマジンのいずれかを炭素源として培養した LA-1 株から調製した無細胞抽出液は高い DHL 変換 (XC 生成) 活性を示し、これを用いることで最大で 2.5 mM の DHA を全て XC に変換することに成功した (Fig. 2)。ただし、この飽和溶解度を超える DHA を添加しても生産される XC に顕著な増加は認められなかったことから、総生産量の向上には反応容量を増やすなどの工夫が必要であった。

続いて、ORF12-13 による XC 以外の化合物の生産性を検証した。6,7-ジヒドロキシプテリン (DHP, 脱アミノされていない DHL) と ORF12-13 を含む無細胞抽出液を反応させた結果、酵素生成物 (グアニン-8-カルボン酸, GC) はほとんど検出されなかった (Fig. 2)。反応 pH、温度、溶媒、基質濃度を変化させても変換率に向上は認められなかったことから、ORF12-13 は基質特異性が高く、本酵素を用いた GC の生産は困難であることが示唆された。

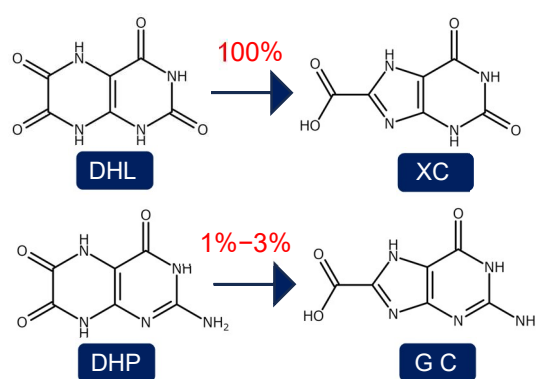


Fig. 2 XC および GC の酵素生産.

### 結論

本研究では、これまでに知られていなかった細菌のプテリン分解酵素遺伝子クラスターに着目し、その遺伝子発現がプテリン構造応答性の転写制御因子 (おそらく TR-1) およびルマジン構造応答性の転写制御因子 TR-2 によって制御されていることを明らかにした。また、無細胞抽出液に含まれるプテリン分解酵素を用いて、化学合成することが困難であるキサンチン-8-カルボン酸を酵素生産することに成功した。