

微生物細胞工場の生産能を飛躍的に向上させることを目的とした、目的化合物を細胞外に排出する膜輸送タンパク質の革新的探索法の開発、排出膜輸送タンパク質の探索および高機能化

川崎 寿

東京大学 大学院農学生命科学研究科
(現 キッコーマン(株) 研究開発本部)

研究の目的

環境意識の高まりと資源の偏在などに起因する地政学的不安定性などを背景として、持続可能性と回復力を高める社会改革が急務となっている。そのための手段のひとつとして、再生可能な資源から価値ある化合物を生産する微生物細胞工場 (MCF) への注目も高まっている。

MCFの細胞内で合成された標的化合物の細胞内から細胞外への排出促進は、一般に商業生産に有益である。しかし、MCFにおける標的化合物の細胞外への排出に係る排出膜輸送タンパク質の探索と選択、および、設計に関する「exporter engineering」は比較的進んでいない。排出膜輸送タンパク質をコードする遺伝子は様々な細菌ゲノム上に多数存在するが、それらがどのような有用化合物を排出するかについての理解は乏しく、さらに、それらの排出基質を現実的なスループットで半網羅的に調べる方法や推定する方法は知られていない。また、膜輸送タンパク質は周囲の脂質分子や膜電位などの影響を受けつつ大きな構造変化を伴いながら機能するが、作動機構の詳細に関する知見は充分ではなく、高機能化戦略は確立していない。

そこで本研究では、MCFの生産能を飛躍的に向上させるための、(1)細胞外への排出を担う膜輸送タンパク質を探索する革新的な技術の開発、(2)細胞外排出が知られていない化合物を排出する膜輸送タンパク質の探索と発見、(3)排出膜輸送タンパク質の高機能化、を目的とした。

方法

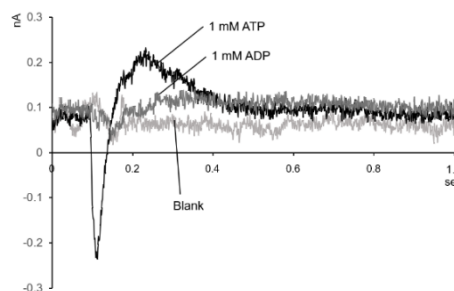
E. coli 由来の細胞膜を用いて solid supported membrane-based electrophysiology (SSM) の技術¹⁾で解析を行うために、用いる *E. coli* の遺伝子型、反転膜胞調製時の細胞残渣を除去する方法、反転膜胞を濃縮する方法を検討した。尚、解析装置としてはナニオンテクノロジーズ社の SURFER 1N を用いた。

5'-イノシン酸 (IMP) 直接発酵生産菌 *Corynebacterium stationis* の IMP 排出膜輸送タンパク質 Cs0286 において、膜貫通ヘリックス (TM) 間相互作用を強化するアミノ酸置換を推定し、その効果を、IMP 生合成を強化した *E. coli* での IMP 生産を指標に評価した。効果が認められたアミノ酸置換について全原子分子動力学シミュレーションを用いて TM 間相互作用エネルギーを計算した。

結果

(1)細胞外への排出を担う膜輸送タンパク質を探索する革新的な技術の開発

膜輸送タンパク質の作用によって基質の化学構造は変化せず、また、トランスポーター型膜輸送タンパク質による輸送速度に対して充分高密度に試料を調製することは容易ではないため、一般に、膜輸送タンパク質の活性測定は困難である。この困難さを電気生理学的原理を用いることで克服してトランスポーター型膜輸送タンパク質の活性を測定することが可能な装置を用いることとした。細菌の膜輸送タンパク質を、当該装置を用いて解析する方法としては、精製タンパク質をリポソームに再構成したプロテオリポソームを用いる方法が中心で、*E. coli* 由来の細胞膜を用いた解析法は確立していない。さらに、細胞内に存在する物質を細胞外に輸送する排出膜輸送タンパク質の活性測定においては、複数種の化合物、特に合成困難な化合物を細胞内に入れることが困難なため、その難度は非常に高い。尚、伝統的生化学実験で用いられている反転膜小胞は、当該装置での解析には小さ過ぎるため使用できない。そこで、我々が細菌細胞をパッチクランプ法で解析するために開発した方法で生成される直径数 μm の反転膜胞²⁾を用いる方法を開発することとした。材料とする細菌として、将来異種発現の宿主として用いる可能性も考慮してまずは *E. coli* を選択した。反転膜胞調製法の概要は既報と同様であるが、反転膜胞の生成頻度において、ペプチドグリカンと外膜を結ぶ Braun のリポプロテインの遺伝子欠損株が優位であることが改めて確認された。パッチクランプ法での解析では、巨大化細胞から反転膜胞抽出後の細胞残渣は抽出後の洗浄操作で除去できる。また、パッチクランプ法での解析では、1つの反転膜胞を用いることから反転膜胞の調製においてその密度は大きな問題にならない。しかし、当該装置では多数の反転膜胞を用いる必要があるため、これらの課題を解決する必要があった。そこで、検討を重ねた結果、Percoll 密度勾配によって、反転膜胞と細胞残渣を効率よく分離すると共に、反転膜胞を濃縮することに成功した。このようにして調製した反転膜胞を用いて、上記装置で膜胞外から膜胞内への膜輸送活性（細胞内から細胞外への輸送に相当）の測定が可能かどうか検討した。その結果、 $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ による H^+ 輸送に由来する電流を観測することに成功した（右図）。



(2)細胞外排出が知られていない化合物を排出する膜輸送タンパク質の探索と発見

(1)で開発する探索方法の確立を待たずに別の方法で、ある有用化合物 X を排出する膜輸送タンパク質の探索を行った。化合物 X の生合成を、異種発現を含めて強化した株に、アノテーション等から化合物 X を排出する可能性のある排出膜輸送タンパク質遺伝子を導入した。その結果、化合物 X を排出する膜輸送タンパク質を見出し、現在抽出法で生産されている化合物 X の発酵生産に初めて成功した。

(3) デジタルバイオ技術を駆使した排出膜輸送タンパク質の高機能化

IMP 排出膜輸送タンパク質 (Cs0286) を高活性化するアミノ酸置換 (G64E) の考察から、MFS 型膜輸送タンパク質において、ひと纏まりとなって機能する N 末側、C 末側の各ローブを構成する TM 間相互作用の強化が、高活性化の普遍的戦略の一つと考えられた³⁾。そこで、同様の効果を狙って、Cs0286 について、G178E、F181E、M413E、V417D の各アミノ酸置換型遺伝子を作製し、その効果を検討した。変異型遺伝子を、IMP 生合成を強化した *E. coli*、AMP 生合成を強化した *E. coli*、化合物 X 生合成を強化した *E. coli* に導入した。その結果、化合物 X の生合成を強化した *E. coli* に M413E 置換型遺伝子を導入した場合に目的化合物の生産量の増加が認められた。そこで、M413E 置換型 Cs0286 における TM 間相互作用エネルギーを計算したところ、期待通り C 末側のローブを構成する TM 間相互作用が強化されていた。これらの結果は、G64E 置換型 Cs0286 で見られた N 末側ローブを構成する TM 間相互作用の強化だけでなく、C 末側のローブを構成する TM 間相互作用の強化も高活性化に繋がることを示すと共に、TM 間相互作用の強化が高活性化に繋がるかどうかは輸送基質にも依存することを示している。

結論

(1) 排出膜輸送タンパク質を探索する革新的な技術の基盤となる反転膜胞の排出活性を SSM 技術で測定することに成功した。(2) 現在抽出法で工業生産されている化合物 X の発酵生産に成功した。(3) C 末側のローブを構成する TM 間相互作用の強化も排出膜輸送タンパク質の高活性化に繋がることを見いだした。

文献

- (1) Kelety, B., Diekert, K., Tobien, J., Watzke, N., Dörner, W., Obrdlik, P., and Fendler, K. (2006) Transporter assays using solid supported membranes: a novel screening platform for drug discovery. *ASSAY and Drug Development Technologies* **4**: 575-582.
- (2) Kuroda, T., Okuda, N., Saitoh, N., Hiyama, T., Terasaki, Y., Anazawa, H., Hirata, A., Mogi, T., Kusaka, I., Tsuchiya, T., and Yabe, I. (1998) Patch clamp studies on ion pumps of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**: 16897-16904.
- (3) Kinose, K., Shinoda, K., Konishi, T., and Kawasaki, H. (2024) Mutational analysis in *Corynebacterium stationis* MFS transporters for improving nucleotide bioproduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **108**: 251.