

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14698

研究課題名(和文) ペプチド輸送体に見る深海性細菌の高水圧適応機構

研究課題名(英文) High-Pressure adaptation in peptide transporters of deep-sea piezophiles

研究代表者

阿部 文快 (Abe, Fumiyo)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30360746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：深海は超高压にさらされた極限環境で、栄養源も乏しく窒素源の確保は生死を分ける。分解された生物の死骸はアミノ酸よりもペプチドとして存在するかもしれない。本研究では深海性細菌のペプチド輸送体に着目し、極限環境における機能の解明を目的とした。ゲノム情報からペプチド輸送体遺伝子群を見だし、大腸菌内発現系の構築に成功した。次にクロマトグラフィーを行い、輸送体標品を得た。これを用いて膜再構成系の構築を目指す。また、 $\gamma$ -Ala-Lys (AMCA)を基質とし、大腸菌に発現させた輸送体の活性を測定した。CCCPで阻害されたことから、プロトンとの共輸送によりペプチドを取り込んでいる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deep-sea environments are characterized by high pressure and poor nutrients, and efficient nitrogen uptake is crucial for survival of organisms under the extreme condition. In this study, we focus on the functionality of peptide transporters in deep-sea bacteria, and elucidate the mechanism of their high-pressure adaptation. The genes encoding peptide transporters were cloned and the transporter proteins were successfully expressed in *Escherichia coli*. They were purified by affinity chromatography and will be subject to reconstitution in lipid vesicles. The peptide transport activity was analyzed using  $\gamma$ -Ala-Lys (AMCA) as a substrate. We found that the activity was inhibited by CCCP, suggesting that the peptide transport is coupled with proton gradient across the plasma membrane.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：深海好圧性細菌 ペプチド輸送体 貧栄養環境 高水圧

### 1. 研究開始当初の背景

深海には超高压に適應した好圧性細菌が棲息し、謎に包まれた生態と彼らが獲得した高水压への適應能力に高い関心が寄せられている。しかし数種の好圧性細菌ゲノムが解読されたものの、“好圧性”を支える固有の遺伝子群は見つからなかった。では個々のタンパク質は高压適應しているのか？一本鎖DNA結合タンパク質など可溶性酵素の例を見る限り、それは明確ではない。そもそも多くの可溶性タンパク質は高压下でかなり安定なのである。一方、生体膜は高压の影響を非常に受けやすい。私たちは酵母細胞膜上のトリプトファン輸送体 Tat1 と Tat2 が、25 MPa で容易に失活しユビキチン分解されることを示した。至適増殖圧力 (< 100 MPa) との対比で、膜タンパク質は最も適切なターゲットであろう。特にペプチド輸送体は生態学的見地からも興味深い。深海のような貧栄養環境では、窒素源の確保が生死を分ける。生物の死骸はアミノ酸にまで分解されず、多くはペプチドで存在するかもしれない。アミノ酸輸送体に比べペプチド輸送体の基質選択性は幅広いから、限られた窒素源を取り込むには有利であろう。また最近、南極コオリウオのペプチド輸送体で、細胞質末端の7アミノ酸残基が低温適應に重要という意外な報告がなされた。そこで本研究では、全ゲノム解析が終了した多数の深海性細菌からペプチド輸送体遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系で精製・膜再構成を行い、それらの圧力特性を解明する。

### 2. 研究の目的

深海の好圧性細菌はなぜ数百気圧もの超高压下で生命維持できるのか？本研究では細胞膜上のペプチド輸送体に着目した解析を行う。可溶性酵素に比べ膜タンパク質は圧力感受性が極めて高く、また貧栄養下での窒素源確保は生存に不可欠である。そこで深度別に分離された深海性γ-プロテオバクテリアから、ゲノム情報をもとにペプチド輸送体遺伝子をクローニングする。そして大腸菌発現系を用いた精製と膜再構成系により圧力特性を解明する。予備的な系統解析では、ペプチド輸送体は種の類縁性よりもむしろ棲息深度でクラスター化された。巧みな生存戦略は栄養源の入り口にあるのではなかろうか？さらにペプチド輸送体の結晶化にもチャレンジする。成功すれば膜タンパク質における高压適應の構造基盤と真の“好圧性”が解き明かされるに違いない。

### 3. 研究の方法

(1) 図1に示した深海性細菌の中から、好圧性を示す *Shewanella violacea* (当研究室所有) と絶対好圧性を示す *Colwellia piezophila* (海洋研究開発機構からゲノムDNAを分与) を選び、ゲノムDNAを鋳型としてPCRによりペプチド輸送体遺伝子群を増幅した。得られ

た断片を低温誘導性プロモーターを持つ pCold I, pCold GST および pCold TF にクローニングし大腸菌 C43 株に導入した。IPTG の濃度と処理時間を変えて発現を誘導し、輸送体タンパク質レベルを抗 6xHis 抗体を用いたウエスタンブロットにより調べた。

次に TALON カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、各輸送体の精製を行った。輸送体タンパク質が単量体であるのか多量体を形成しているのか、あるいは変性や凝集が見られるのかを定性的に調べるため、Docusate を電荷運搬体とする非変性ゲル電気泳動 (Native PAGE) を行った。

(2) *S. violacea* のペプチド輸送体 PepTsv 遺伝子を pCold TF に連結したプラスミド、あるいはTFの直後に GFP を融合した PepTsv 発現プラスミドを大腸菌 C43 株に導入した。大腸菌内での PepTsv の局在を蛍光顕微鏡下で観察した。この大腸菌発現系を用いて蛍光ペプチド -Ala-Lys (AMCA) を基質とした取り込みアッセイを行った。

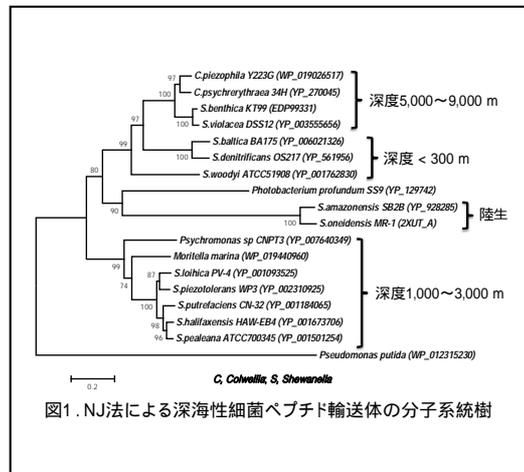


図1. NJ法による深海性細菌ペプチド輸送体の分子系統樹

### 4. 研究成果

(1) データベース上の各種深海性細菌ゲノムから、*Shewanella oneidensis* (陸生の菌) のペプチド輸送体 PepT<sub>So</sub> のホモログを検索した。PepT<sub>So</sub> ではX線結晶構造解析によりその立体構造が解かれている。系統解析の結果、ペプチド輸送体は種の類縁性よりもむしろ棲息深度ごとにクラスター化されることがわかった (図1)。*S. violacea* には4個のペプチド輸送体の遺伝子が見いだされたため、それらを PepTsv1, PepTsv2, PepTsv3, および PepTsv4 と命名した。また、*C. piezophila* には2個のペプチド輸送体の遺伝子が見いだされたため、それらを PepTcz1 および PepTcz2 と命名した。いずれの細菌も好冷性を示すことから低温誘導性プロモーターを持つ pCold ベクターが適切と考え、まず pCold I に各遺伝子を挿入した。大腸菌 C43 株に導入後、6xHis タグに対する抗体でウエスタンブロットを行った。しかしいずれの輸送体も発現は確認されなかった。大腸菌内での異種遺伝子発現に

において、末端に連結した大きなタンパク質が標的タンパク質を安定化することがしばしば見られる。そこで、pCold GST ベクターを用い輸送体の N 末端に GST を融合し発現を試みた。抗 GST 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、いずれの輸送体においても高レベルの発現が確認された。そこで菌体を大量培養し、グルタチオンカラムを用いて精製を行った。その結果、CBB 染色で確認されるレベルで GST 融合型ペプチド輸送体が精製された。これらの精製標品について Docusate を用いた Native PAGE を行った。12 回膜貫通領域を持つ複雑なタンパク質だが、立体構造が保持されていれば単量体または多量体の明瞭なバンドとして確認されるはずである。しかしながら、GST 融合型ペプチド輸送体はいずれもスミアな泳動パターンを示し、精製されたものの高次構造が崩壊した標品であることが示唆された。従って、GST 融合は適切でないことが考えられた。

そこで次に pCold TF ベクターを用いた発現系について検討した。TF は大腸菌の分子シャペロン Trigger factor であり、タンパク質のフォールディングを促進する。6xHis タグを有するため TALON を用いたクロマトグラフィー精製が可能である。様々な条件で発現誘導を行ったところ CBB 染色で確認されるレベルで精製することに成功した。そこで次に Docusate を用いた Native PAGE を行った。その結果、GST 融合で見られたスミアな泳動パターンとは異なり、明瞭なバンドが確認された(図2)。分子量による推定から、PepTsv1, PepTcz1 および PepTcz2 はおそらく単量体または2量体として存在することが示唆された。なお、図2には PepTsv1 に関する結果のみを示す。

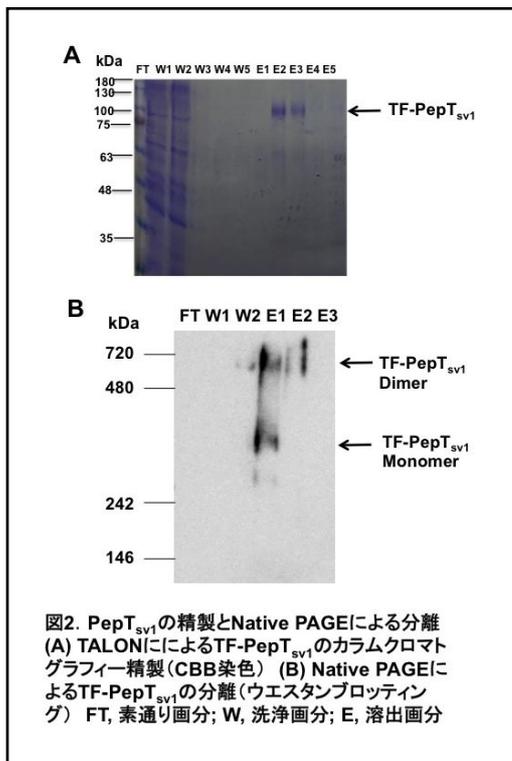


図2. PepTsv1の精製とNative PAGEによる分離 (A) TALONによるTF-PepTsv1のカラムクロマトグラフィー精製(CBB染色) (B) Native PAGEによるTF-PepTsv1の分離(ウエスタンブロッティング) FT, 素通り画分; W, 洗浄画分; E, 溶出画分

このようにして TF を融合することで、深海の好冷好圧性細菌ペプチド輸送体を高次構造を維持したまま精製することが可能になったと言える。ただし膜再構成系の構築と結晶化には大量のタンパク質標品が必要となるため、現在、実験系のスケールアップに取り組んでいる。

(2) 前述した膜再構成系の構築と並行し、深海の好冷好圧性細菌ペプチド輸送体を大腸菌内で発現させ、*in vivo* で機能解析を行う試みを行った。ここでは、PepTsv1 のみについて報告する。まず TF-GFP-PepTsv1 を発現するプラスミドを構築し、大腸菌内での可視化を行った。その結果、輸送体タンパク質は細胞膜にも見られたが、細胞の両極末端に凝集体としても存在することがわかった。発現を低レベルになるようコントロールしてみたが、局在パターンに変化は見られなかった。

次に -Ala-Lys (AMCA)を基質としたペプチド取り込みアッセイを TF-PepTsv1 および TF-GFP-PepTsv1 の発現株について行った。その結果、対照として用いた TF および TF-GFP の発現株では基質の取り込みは全く見られなかった。一方、TF-PepTsv1 発現株についても -Ala-Lys (AMCA)の取り込みは確認されなかった。ところが興味深いことに、TF-GFP-PepTsv1 の発現株については有意なペプチド取り込みが見られた。この取り込みは、ジペプチド Ala-Trp により阻害され、またプロトン脱共役剤である CCCP によっても阻害された。このことは、TF-GFP-PepTsv1 による -Ala-Lys (AMCA)取り込みがプロトン濃度勾配と共役していることを示唆する。TF-PepTsv1 が機能的でない理由は不明だが、GFP を融合することで大腸菌細胞膜上での安定性が向上した可能性などが考えられる。この系を利用して現在、ペプチド輸送体に様々な変異を導入し、基質輸送に重要なアミノ酸残基の同定を行っている。

(3) 深海性ペプチド輸送体の機能解明とした本研究目的とは異なるが、基質輸送体という広い枠組みの中で相互理解が深まると考え、次のような研究も実施した。

広島大学北村憲司博士と共同で、出芽酵母のペプチド輸送体 Ptr2 を介した Blasticidin S という抗菌剤の取り込みに関する研究を行った。また、ヒトトリプトファン輸送体 MCT10/hTAT1 の酵母細胞内発現系を構築し、基質特異性と機能に重要なアミノ酸残基の同定を行った。酵母の機能未知遺伝子 YRP153W がトリプトファン輸送体 Tat2 の細胞膜局在に重要であることを見いだした。これらについて以下に発表論文を掲載する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Kurosaka, G. and Abe, F. (2018) The YPR153W gene is essential for the pressure tolerance of tryptophan permease Tat2 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **High Pressure Research** 38, 90-98.

2. Uemura, S., Mochizuki, T., Hashimoto, T., Masukawa, M., Kurosaka, G., and Abe, F. (2017) Functional analysis of human aromatic amino acid transporter MCT10/TAT1 using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta** 1859, 2076-2085

3. Kitamura, K., Kinsui, E. Z., and Abe, F. (2017) Critical role of the proton-dependent oligopeptide transporter (POT) in the cellular uptake of the peptidyl nucleoside antibiotic, blasticidin S. **Biochim. Biophys. Acta** 1864, 393-398.

4. Nagano, Y., Konishi, M., Nagahama, T., Kubota, T., Abe, F., and Hatada, Y. (2016) Retrieval of deeply buried culturable fungi in marine subsurface sediments, Suruga-Bay, Japan. **Fungal Ecol.** 20, 256-259.

5. Koyama, S., Tsubouchi, T., Usui, K., Uematsu, K., Tame, A., Nogi, Y., Ohta, Y., Hatada, Y., Kato, C., Miwa, T., Toyofuku, T., Nagahama, T., Konishi, M., Nagano, Y. and Abe, F. (2015) Involvement of flocculin in negative potential-applied ITO electrode adhesion of yeast cells. **FEMS Yeast Research** 15, fov064.

6. Mochizuki, T., Kimata, Y., Uemura, S. and Abe, F. (2015) Retention of chimeric Tat2-Gap1 permease in the endoplasmic reticulum induces unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research** 15, fov044.

〔学会発表〕(計1件)

根來将吾, 翠川雄斗, 加藤千明, 阿部文快, 深海好圧性細菌 *Shewanella violacea* におけるペプチド輸送体の大腸菌内発現と機能解析、日本農芸化学会 2018 年大会 (名古屋) 2018 年 3 月 16 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 文快 (ABE, Fumiyoshi)  
青山学院大学・理工学部・教授  
研究者番号：30360746

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

翠川 雄斗 (MIDORIKAWA, Yuto)  
本間 絢 (HONMA, Aya)  
梶原 玲菜 (KAJIHARA, Reina)  
根來 将吾 (NEGORO, Shogo)  
七谷 圭 (NANATANI, Kei)  
小林 拓也 (KOBAYASHI, Takuya)