

令和元年6月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07653

研究課題名(和文) 有機酸生産の効率化へ向けた有機酸排出トランスポーターの構造と機能の解析

研究課題名(英文) Structural and functional analyses of organic acid exporters for efficient organic acid production

研究代表者

七谷 圭 (NANATANI, KEI)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：00547333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：有機酸の菌体外への排出強化による微生物を用いた有機酸生産の効率化を最終目標とした。本研究では、有機酸排出トランスポーターの構造と機能メカニズムに明らかにするため、構造解析ならびに生化学的解析を実施した。はじめに、有機酸排出トランスポーターの結晶構造解析に向けて、有機酸トランスポーターとそのホモログ遺伝子を好熱菌等からクローニングした。各ホモログについて大腸菌を用いた発現と熱安定性の解析を実施した。発現に成功したホモログについて、精製系を構築し、精製タンパク質を用いて、タンパク質の結晶化スクリーニングを実施した。その結果、微細な結晶を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物を用いた物質生産において、従来は主に微生物の菌体内での生合成反応の強化に焦点を当てた研究開発が進められてきた。しかしながら、生合成産物の細胞外への排出が滞ると生合成反応は阻害され生産効率を下げる原因となることが明らかとなった。そこで本研究では、有機酸生産の効率化に向けて有機酸の排出強化を目的とし、有機酸トランスポーターの構造と機能メカニズムの解明を目的とした。膜タンパク質は、膜に局在するため疎水性が高く、結晶構造解析が困難であると言われている。このような状況に置いて、本研究では有機酸排出トランスポーターホモログの結晶化に成功し、構造解明に向けて大きく前進した。

研究成果の概要(英文)：The final goal of our research is the achievement of effective organic acid production with microbial by enhancing the target organic acid efflux. As part of this research, structural and biochemical studies were conducted to reveal the structure and functional mechanism of organic acid exporter. First, to solve the crystal structure of the organic acid exporter, we cloned organic acid transporter genes and homologous genes from micro-bacteria, such as thermophilic bacteria. The cloned organic acid transporters and homologue proteins were expressed in *E. coli*, and we studied the thermal stability of these proteins. The expressed homologue proteins were purified and we conducted a crystallization screening. As a result, micro-crystals were observed in several conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物を利用した物質生産において、これまでの研究開発は主に細胞内代謝の強化・改変、新規代謝経路の導入に焦点が当てられていた。近年、細胞内代謝経路に着目した試みは、既に飽和に達しつつあり、物質生産効率化の限界を迎えている。そこで、応募者らはこれまでに無い新たな着眼点として、生産化合物を菌体外に排出する排出輸送体(トランスポーター)に着目した。有機酸などの極性のある化合物は細胞膜透過性が低いことから、菌体内で生産された化合物は、排出輸送体(トランスポーター、チャンネル)を通り細胞外に排出される。2007年に、グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* が、グルタミン酸排出チャンネルによってグルタミン酸を排出していることが明らかとなり、微生物を用いた化合物生産における排出輸送体の重要性が認識されるに至った。*C. glutamicum* の有するコハク酸排出輸送体(SucE1)は、高分子ポリマーのビルディングブロックの一つであるコハク酸を菌体外に排出し、コハク酸生産を効率化している。目的化合物の菌体外への排出能力が十分でない場合、菌体内で生合成された生産物は菌体内に蓄積する。菌体内の目的化合物の蓄積は、負のフィードバックを引き起こし、生合成反応を阻害する。したがって、従来の菌体内の代謝系の強化に加えて、化合物の排出を強化すること、効率的な物質生産を実現するためには重要である。

2. 研究の目的

本研究は、コハク酸をはじめとする産業的に有効性の高い有機酸の生産効率化をめざし、有機酸の菌体外への排出を担うトランスポーター(AAEx トランスポーター)に焦点を当て、分子構造と機能を解析することにより、基質輸送メカニズムを解明することを目的とした。基質輸送メカニズムを解明することにより、タンパク質工学的手法により有機酸の輸送を強化することにより、効率的な有機酸生産の実現に貢献する。

3. 研究の方法

(A) AAEx トランスポーターの結晶構造解析

トランスポーターをはじめとする膜タンパク質は疎水性の領域を多く有しているため、結晶化は非常に難しいと言われている。また、トランスポーターは可動性に富むことから安定性が低く、そのことも結晶化を妨げている。そこで本研究では、好熱性細菌をはじめとする微生物より、熱安定性、単分散性が高く、結晶の得やすいと推定される AAEx トランスポーターを探索した。発現に成功し、熱安定性の高いホモログについて、界面活性剤を用いて可溶化後、Ni アフィニティークロマトを用いて精製を行った。精製タンパク質について、蒸気拡散法による結晶化を実施し、得られた結晶を X 線回折実験を実施した。

(B) AAEx トランスポーターの機能に重要なアミノ酸残基の探索と機能解析

トランスポーターは膜に局在し膜貫通ドメインを有する。基質化合物は膜貫通ドメインに結合し膜の反対側に輸送される。トランスポーターの基質輸送メカニズムを解明するためには、基質の輸送を解析する手法が不可欠である。研究代表者らは、これまでプロテオリポソームと呼ばれる人工膜脂質に膜タンパク質を再構成し、基質の輸送活性の計測を行ってきた。しかし、プロテオリポソーム再構成法は、実験操作が複雑であり、スループット性が低いという欠点がある。本研究では、これらの欠点を克服するため大腸菌遺伝子欠損株を用いて、迅速に輸送活性を測定する手法の開発を行った。

4. 研究成果

(A) AAEx トランスポーターの結晶構造解析

好熱菌をはじめとする微生物のゲノム DNA を鋳型として、PCR により AAEx トランスポーターのホモログ遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を誘導性プロモーターを有した発現プラスミドのマルチクローニングサイトにクローニングした。ホモログ遺伝子の遺伝子配列は、DNA シークエンスにより確認した。構築したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、AAEx トランスポーターホモログ発現大腸菌株を造成した。これらの菌株を LB 培地で培養、対数増殖期に誘導剤を添加し、ホモログ遺伝子を細胞膜上に高発現させた。遠心により菌体を集菌後、菌体を破砕し、超遠心により細胞膜を取得した。界面活性剤を用いて細胞膜を可溶化、可溶化画分を Ni アフィニティークロマトグラフィーに供し、ホモログタンパク質を精製した。精製タンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーに供し、高純度タンパク質を取得した。精製タンパク質を加熱処理後、ゲルろ過クロマトグラフィーのピーク形状を観察することにより、精製タンパク質の熱安定性を検討した。また、同様の方法により精製タンパク質が可溶化状態で維持できる溶媒条件を検討した。これらの最適安定条件下で精製することにより、安定なタンパク質の取得に

成功した。これらのタンパク質を用いて、タンパク質結晶化キットを用いて、結晶化条件の探索を行った。いくつかの条件において、微細な結晶を観察することができた。

(B) AAEx トランスポーターの機能に重要なアミノ酸残基の探索と機能解析

排出輸送体をコードする遺伝子を欠損した株は、高濃度の標的化合物を含んだ培地において生育させた場合、標的化合物が細胞内に高濃度に蓄積することから、生育阻害を引き起こす。標的とする化合物がアミノ酸である場合には、アミノ酸が2つ結合した化合物(ジペプチド)が細胞内に取り込まれやすい性質があるため、低濃度で生育阻害が引き起こされる。この遺伝子欠損株に目的の化合物の排出を担うトランスポーターを導入することにより、生育阻害が解消され、生育の回復が見られる。本研究では、AAEx トランスポーターの機能に重要なアミノ酸残基を同定することを目的として、大腸菌アラニン排出輸送体欠損株を用いて、AAEx トランスポーターの一つであるアスパラギン酸：アラニン交換輸送体(AspT)の導入による、生育の回復と観察することにより AspT の機能の解析を実施した。その結果、Ala ジペプチド含有培地において、Ala 排出輸送体欠損株の生育は、AspT の導入により優位に回復したことから、AspT の機能を証明することができた。本手法は、従来のプロテオリポソーム再構成法と比較して、スループット性が高く、今後の AspT の機能解析において威力を発揮すると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 増田歩、七谷圭、勝部哲、米山裕、阿部敬悦、大腸菌 Ala 排出欠損株を用いた乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の輸送評価系の構築、日本生物工学会 2017 年度北日本支部 福島シンポジウム、2017 年 12 月 25 日、コロッセふくしま(福島市)
2. 千葉文香、金ななせ、七谷圭、阿部敬悦、Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の結晶化に向けた熱安定変異体探索、日本生物工学会 2017 年度北日本支部 福島シンポジウム、2017 年 12 月 25 日、コロッセふくしま(福島市)
3. 宮本あかり、鈴木聡美、小笠原諭、七谷圭、阿部敬悦、乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の高生産系の構築およびその解析、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19-21 日、名古屋工業大学 4 号館ホール(名古屋市)
4. 千葉文香、金ななせ、鈴木聡美、七谷圭、阿部敬悦、低親和性基質結合による乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体(AspT)の熱安定性の向上、日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会、2016 年 12 月 19-21 日、名古屋工業大学 4 号館ホール(名古屋市)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：米山 裕
ローマ字氏名：YONEYAMA HIROSHI

研究協力者氏名：石谷 隆一郎
ローマ字氏名：ISHITANI RYUICHIRO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。