

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05343

研究課題名(和文) ゲノム情報を利用した共生的プロピオン酸代謝系酵素の成熟化遺伝子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Search and functional analysis of maturation genes for syntrophic propionate oxidation using genomic information

研究代表者

高坂 智之 (Kosaka, Tomoyuki)

山口大学・大学研究推進機構・准教授

研究者番号：70500453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム情報から酵素複合体に関連する遺伝子群を可視化することを可能にしたことから、機能が未知であっても機能化に必要な遺伝子を発掘出来るようになった。酵素の成熟化遺伝子の機能解析を多数は行えなかったが、大腸菌においてヒドロゲナーゼを成熟化するプロピオン酸酸化細菌由来エンドペプチダーゼの機能を示すことが出来、また、手法改善による機能解析の可能性を示唆した。そして、大腸菌で活性が見られない異種微生物由来のコハク酸脱水素酵素やヒドロゲナーゼの分析により、膜タンパクの機能化を目指す場合、大腸菌での発現をまずは改善する必要がある、それは大腸菌株のゲノム改変により可能になる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌での異種遺伝子発現は数多く試みられてきているが、機能がほとんど見られない場合は改善方法が明快でないため研究の道筋が立たない。今回ゲノムの情報から特定の遺伝子の機能化に必要な関連遺伝子を示唆することが可能であり、その可視化方法を構築したことから、ゲノム情報を基にすれば異種細胞での発現遺伝子の機能化の期待値を上げることが可能である。つまりは、活用されていない、そして機能が未知のままである遺伝子の活用の道筋を立てることを可能にする成果である。

研究成果の概要(英文)：We have constructed the procedure for visualizing related genes for protein complex functions from genomic information, which provides the way to explore the required genes for function when the function of it is unknown. Although the functional analysis of candidate maturation genes was not so successful, the function of endopeptidase of propionate oxidizing bacteria for [NiFe]-hydrogenase maturation in Escherichia coli cell was revealed by our analysis. In addition, the improvement of the method of expression regulation of these maturation genes was shown to be the key to their analysis. Furthermore, the analysis of non-functional membrane-protein complexes of other microorganisms, such as succinate dehydrogenase and [NiFe]-hydrogenase, in E. coli should improve its expression before considering its activity, which was improved by genomic modification of expressing E. coli cells.

研究分野：微生物機能学

キーワード：ゲノム情報 成熟化因子 大腸菌 異種発現 プロピオン酸酸化細菌 コハク酸脱水素酵素 ヒドロゲナーゼ 膜タンパク質

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

嫌気性環境で起こるメタン発酵では、酪酸、プロピオン酸、酢酸といった有機酸は蓄積しやすい。理由は、これら有機酸の酸化分解を行う嫌気発酵性細菌は水素資化性メタン生成菌と共生して行う特異な代謝機構により生育しており、得られるエネルギーが限られていることに起因する¹⁾。これら細菌の代謝について、メタン発酵の安定化や生化学的な興味から研究が行われている。このうちプロピオン酸酸化細菌はメチルマロニルCoA経路をプロピオン酸代謝に利用しており²⁾、その反応に関わる遺伝子³⁾、そしてその発現が転写⁴⁾及び蛋白レベル²⁾で確認された。さらに、プロピオン酸代謝の進行には、膜電位、キノン、ATP合成酵素が必要であり、膜電位を利用するコハク酸脱水素酵素(SDH)と [NiFe]-ヒドロゲナーゼ(HYD)が重要な酵素であることが示唆されている。しかし、これら酵素がどのように特異的機能を発揮しているか解析するには、酵素タンパク質を精製、そして改変して分析する必要がある。しかしコロニーを形成し難いため、プロピオン酸酸化細菌の遺伝子組換え系は存在しない。

そこで我々は大腸菌でのプロピオン酸酸化細菌の遺伝子発現に取り組んだ。大腸菌は情報が非常に多く、そして様々な発現ベクター系、遺伝子破壊株の構築方法、そして一遺伝子破壊株ライブラリー⁵⁾があり、プラットフォームとして強力である。我々には既にプロピオン酸酸化細菌の遺伝子発現が大腸菌で試み、解析に成功した例がある^{6,7)}。しかし、プロピオン酸代謝系酵素であるSDH及びHYDは、大腸菌で発現させても活性が見られなかった。つまり、ある種の酵素は大腸菌で発現させるだけでは機能しないことを示唆している。発現させたSDHを分析した結果、補欠分子族フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)がサブユニットSdhAに結合していないことが明らかとなった。同様の結果は枯草菌のSDHでも報告されている⁸⁾。ただ、補欠分子族が必要な酵素の多くが成熟化タンパク質を要求することが明らかとなっている。実際に、大腸菌はSdhEがSdhAにFADを結合することが知られる⁹⁾。しかし、ゲノム情報を分析してみたところ、プロピオン酸酸化細菌を含む多くの微生物がSdhEのホモログを有していないことがわかった。つまり、種が違えば異なる成熟化遺伝子が必要であり、プロピオン酸酸化細菌のSDHの成熟化遺伝子がゲノム内に存在していると考えられる。そして、HYDも同様に成熟化遺伝子が存在すると考えられる複合体酵素である。

これらの事から、大腸菌で異種発現させた酵素が機能を示さない場合、その酵素の成熟化タンパク質が元細胞内に存在しているのではないかと考えた。ある種の酵素、例えば補欠分子族が結合する酵素には時に成熟化が必要であり、その成熟化に関わる遺伝子は必ずゲノムにコードされている。つまり、ゲノム情報を活用してその成熟化を担う未知遺伝子を選抜出来るのではないか。そして、成熟化遺伝子により酵素の機能的発現が可能になるのではないだろうか。

2. 研究の目的

補欠分子族の結合のような成熟化を要する酵素の成熟化遺伝子の選抜を、ゲノム情報を活用して実施する方法を構築する。さらに、その成熟化遺伝子候補の機能解析方法を構築すると共に、成熟化遺伝子を活用して異種微生物で成熟化が必要な酵素の機能解析が可能となることを示す。この解析をプロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝系酵素であるコハク酸脱水素酵素(SDH)並びに[NiFe]-ヒドロゲナーゼ(HYD)を対象として、ゲノム情報を基にそれぞれの酵素の成熟化遺伝子候補を選抜する。そして、選抜された遺伝子の機能を異種微生物で解析すると共に、その成熟化遺伝子によって酵素の機能化が可能になることを示す。

3. 研究の方法

計算機を用いたゲノム情報を基にした情報分析方法の検討と大腸菌を宿主に異種遺伝子を発現させその機能の解析による分析を試みた。

(1) ゲノム情報を基にした情報分析方法の検討

予備検討では、解析対象となる酵素遺伝子のアミノ酸配列を基にした分子系統に対して、ゲノム内の全遺伝子のホモログを系統に存在する微生物が有するかどうかを分析することで、酵素の成熟化遺伝子を選抜出来ると推察していた。残念ながらこのアイデアは余り機能せず、代わりに解析対象遺伝子のゲノム周辺における遺伝子クラスターを対象遺伝子の機能と関与する遺伝子が含まれていることが多いため、その遺伝子の機能クラスターが解析対象の遺伝子の分子系統に応じて異なるのではないかとアイデアが浮上した。このアイデアを基に計算機による解析を試みた。プロピオン酸酸化細菌の特定の遺伝子をクエリに、保有する微生物ゲノム情報データベース(系統により選抜。1969 genome)に対して相同タンパク質の検索を行い、解析遺伝子のホモログ遺伝子セットを作成した。得られた遺伝子セットを用いて、それぞれのゲノム内の遺伝子クラスターを抜き出し、その全遺伝子を相同性検索およびクラスタリングにより機能遺伝子のクラスターを作成し、遺伝子数の多い順に番号を割り振った。この関連遺伝子クラスターの保存性が解析対象遺伝子の分子系統においてどのように分布しているかを分析した。解析対象には当初SDHの活性中心があるSdhA(フラボプロテイン)を用いていたが、分析結果を比較検討することが難しかったことから、データベースの充実しているヒドロゲナーゼ(HydDB)¹⁰⁾に解析対象を移行し、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの活性中心があるラージサブユニットであるHyaAで解析方法の検討を行った。検討の結果構築した解析方法の計算機での自動化は、各解析プログラム、blastp, Markov clustering, MUSCLE, NJ tree construction, TreeCluster, ggtreeを各種言語 R, ruby, pythonを用いて構築した。このようにして構築した解析手法を用いて再度SDHの解析を実施した。

(2) 大腸菌を宿主に異種遺伝子を発現させその機能の解析による分析

大腸菌の各種発現ベクターに対し、SDHは大腸菌*sdhCDAB*、枯草菌*sdhCAB*、コリネ型細菌*sdhCAB*、プロピオン酸酸化細菌*sdhCAB*の遺伝子をそれぞれ、HYDはプロピオン酸酸化細菌の遺伝子*hyaA*, *hyaB*, *hyaC*, *nrFD*の4つの遺伝子をクローニングした。異種遺伝子を発現させる大腸

菌として、広く用いられているBL21 (DE3)だけでなく膜タンパク質の発現に効果があると言われるC41 (DE3)も用いた。また、BW25113を親株とする一遺伝子破壊株ライブラリーやλ REDリコンビネーションを用いることで、解析対象となる遺伝子やその関連遺伝子の多重破壊株を構築して用いた。SDHの解析には、大腸菌のコハク酸脱水素酵素SdhCDABならびにフマル酸還元酵素FrdABCD、さらにはSdhAの成熟化因子であるSdhEの破壊株を構築した。HYDの解析には、破壊株として大腸菌が持つ3つのヒドロゲナーゼの活性中心をコードする遺伝子 *hyaB*, *hybC*, *hycE* を全て破壊した株や一遺伝子破壊株を用いて解析を行った。また、HYDの成熟化遺伝子候補群のホモログを破壊した一遺伝子破壊株を用いた。遺伝子の発現に用いるプロモーターには、SDHの場合、大腸菌のSDHプロモーターとT5およびT7プロモーターを発現調節の検討に用いた。HYDの場合、主にアラビノースプロモーターpBADを用いた。SDHの機能解析については、遺伝子を発現させた細胞の膜による酵素活性の測定、さらにはHis-tagによるサブユニットや全サブユニットの生成などを試みた。SdhAへのFADの結合はUV照射による蛍光観察を行い、FeSクラスターやシトクロムbに関してはスペクトラムによる分析を行った。HYD発現株の水素生成はアルゴンガスをキャリヤーとするTCD検出器付ガスクロマトグラフィーを用い、HYD酵素活性はベンジルピオロゲンを用いた方法¹¹⁾により特定の酵素を細胞で測定した。タンパク質発現確認は蛍光タンパク質 (RFP および Venus) を融合し、蛍光を測定した。また、His6やFLAGといったTagをタンパク質に付与し、抗体や精製により発現確認を行った。

4. 研究成果

ゲノム情報から解析対象となる酵素の機能化に関わる遺伝子を明らかにすることを目的に、基本高温性プロピオン酸酸化細菌の持つ複合体酵素の大腸菌での発現を目指し、それらの酵素の成熟化に関与する遺伝子を解析することを目指した。研究は、(1) ゲノム情報を基にした複合体タンパク質の成熟化に関する遺伝子の可視化機構の検討、(2) プロピオン酸酸化細菌のコハク酸脱水素酵素の成熟化に関する研究、(3) プロピオン酸酸化細菌の[NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟化に関する研究、の三つからなる。それぞれの研究成果を報告する。

(1) ゲノム情報を基にした複合体タンパク質の成熟化に関する遺伝子の可視化機構の検討

SDHやHYDの成熟化に関わる遺伝子をゲノム情報から見出すことを目指し、方法論の構築を目指した。遺伝子の機能に関わる遺伝子はゲノムにコードされていること、そして原核生物ではゲノム上に関連遺伝子がクラスターを形成していくことから、ゲノム情報から酵素の成熟化に関わる遺伝子を可視化することを検討した。解析対象にはヒドロゲナーゼを選抜した。ヒドロゲナーゼはすでにアミノ酸配列情報を元にした情報学的解析によりHydDB¹⁰⁾が発表されており、我々が試みる分類方法の検証が可能であった。まず、系統から選抜したゲノムデータベースを構築し、そのデータベースを用いて、ターゲット遺伝子のホモログ遺伝子セットを作成した。この遺伝子セットそれぞれの遺伝子がゲノム上で周辺に形成しているクラスターを分析することにより、関連遺伝子を可視化した。この方法により、[NiFe]-ヒドロゲナーゼサブユニットの分子系統によるホモログの分類と関連遺伝子のバリエーションが一致すること、そしてそのゲノムの存在比がリスト化できることがわかった。我々はこの手法の自動化に取り組み、ターゲット遺伝子だけでなくその関連遺伝子においても同様の解析を計算機によって実施可能な系を構築した。この成果により、複合体の機能化に関与する遺伝子を可視化できるだけでなく、異種発現のホストにおいて足りない遺伝子を見出すことや、最も存在する遺伝子セットが近いホストを提示することが可能となった。この方法をSDHに再度適用したところ、手動で解析した際と同様の結果を自動で出力することが出来た。また、この解析によっても、我々が解析しているプロピオン酸酸化細菌のSDHは3つのサブユニットのみが保存されており、それ以外の遺伝子、つまりは新たなSdhA成熟化遺伝子が存在する可能性は低いことが示唆された。

(2) プロピオン酸酸化細菌のコハク酸脱水素酵素 (SDH) の成熟化に関する研究

表1 異なる微生物のSDHサブユニットを大腸菌で発現させた結果

大腸菌での発現	グラム陰性菌		グラム陽性菌	
	大腸菌	コリネ型細菌	枯草菌	プロピオン酸酸化細菌
全サブユニット				
発現	+++	+	+	+
FAD結合	+++	?	+	+
活性	++	+	-	-
個別サブユニット				
SdhA (フラボ)				
発現	+++	+++	+++	+++
FAD結合	+	-	-	-
SdhB (Fe-Sクラスター)				
発現	+	+	+	+
SdhC (D) (膜, シトクロムb)				
発現	+	-	+	+
in vitro 再構成				
FAD結合	NT	?	+	?
活性	NT	NT	-	NT

NT: Not Tested

SDHは、フラボプロテイン、Fe-Sクラスター、シトクロムbといった3つのサブユニットからなり、細菌から人ミトコンドリアまで幅広い生物が保持しているよく知られた酵素である。ただ、大腸菌で異種発現をさせた際に酵素活性が発揮されず、我々はその原因としてフラボプロテインへのFADの共有結合が起きないことと推察した。その証拠としてプロピオン酸酸化細菌のコハク酸脱水素酵素遺伝子 (*sdhCAB*) を発現させたが、酵素活性は測定できなかった。我々はこ

の結果が一般的なのか我々が解析する微生物特有であるかを明らかとするために、グラム陽性菌である枯草菌 *Bacillus subtilis* およびコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* のSDHも大腸菌での異種発現を試みた。その結果、それぞれのフラボプロテインのみを大腸菌で異種発現させた際には、大腸菌のもののみFADの共有結合が見られた。一方、複合体の全てのサブユニットを同時に大腸菌で異種発現させた際には、コリネ型細菌と大腸菌のみ活性が見られた。この時のFADのフラボプロテインへの共有結合は、不明瞭ながら試した全てのタンパクにおいてみられたことから、フラボプロテイン以外のサブユニットの存在がFADの共有結合に必要なのではないかと推察した。この考えをさらに進め、枯草菌のコハク酸脱水素酵素の全てのサブユニットを別々に大腸菌で発現させ、*in vitro*にてフラボプロテインへのFAD結合を確認したところ、膜サブユニットの存在下においてFADの結合が確認された。残念なことに酵素活性は*in vitro*再構成では確認できず、理由は明快ではないが、他のサブユニットの成熟化に問題がある可能性が示唆されている(表1)。今回の我々の解析により、複合体の場合他のサブユニットの存在が酵素の成熟化に影響を与えること、そしてその機構の存在を異種発現による解析により示した。なお一連の解析において、大腸菌BW25113では異種SDHの発現量は非常に低く、C41(DE3)において若干ながら改善が見られた。また膜サブユニットは発現の結果生育の低下およびタンパク質の生成が悪くなる傾向にあり、成熟化を検討する前にタンパク質の合成の改善を行う必要があることが明らかとなった。

(3) プロピオン酸酸化細菌の[NiFe]-ヒドロゲナーゼ(HYD)成熟化に関する研究

プロピオン酸酸化細菌にあるHYDは膜上に存在し、コハク酸酸化により生成されるメナキノールを酸化しその電子とプロトンから水素を生成する。この一連の反応はプロピオン酸酸化経路において重要であるがこの酵素の機能化を大腸菌で試みた。遺伝子を発現ベクターにクローニングし大腸菌 *hycE*破壊株に導入したが、水素生成および酵素活性の両方とも、遺伝子導入による影響を見ることは出来なかった。そこで我々は[NiFe]-ヒドロゲナーゼのラージサブユニットの成熟化に関わる酵素遺伝子の機能を大腸菌で可視化することを試みた。この解析には2つの目的があり、成熟化に関わる遺伝子の機能を異種発現により示すことと、大腸菌が持つ成熟化遺伝子の機能との相補性による特異的成熟化酵素の確認である。成熟化遺伝子の大腸菌破壊株のいくつかはヒドロゲナーゼ活性が明確に低下しており、それらの遺伝子をターゲットにプロピオン酸酸化細菌の相同遺伝子による補完を試みた。残念ながら厳密な誘導が可能なことで知られるアラビノースプロモーターを用いたにもかかわらず、幾つかの成熟化遺伝子は大腸菌の遺伝子でも濃度依存的な補完を示さず、この実験系では発現制御の厳密さが求められることが課題として残った。唯一エンドペプチダーゼである *hyaD* において、プロピオン酸酸化細菌の遺伝子による補完が確認された(表2)。この結果を踏まえて、大腸菌でヒドロゲナーゼとエンドペプチダーゼの同時発現を試みた。異種遺伝子の誘導発現による生育阻害および酵素活性低下が見られ、*hyaD* 遺伝子の発現が行われていることは示されたが、最終的な[NiFe]-ヒドロゲナーゼによる活性や水素生成は観察されていない。我々は本研究を異種遺伝子発現の場合、酵素の成熟化に関わる遺伝子が機能化に重要であるという推察の下進めてきたが、異種遺伝子、特に膜タンパク質の場合、タンパク質がほとんど合成されていない可能性が高いことが示唆されてきており、この課題の解決が今後研究を進めていく上で重要な要素であることが明らかとなった。

表2 [NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟化因子の大腸菌ホモログ補完実験の結果

大腸菌破壊株	プロピオン酸酸化細菌ホモログ	HYD2活性	補完：大腸菌	補完：プロピオン酸酸化細菌
BW25113	-	+++	NT	NT
$\Delta hypF$	PTH_1696	-	NT	NT
$\Delta hypA$	PTH_1694	-	-	-
$\Delta hypB$	-	-	NT	NT
$\Delta hypC$	-	++	NT	NT
$\Delta hypE$	PTH_1699	-	-	-
$\Delta hybG$	PTH_1697	++	NT	NT
$\Delta hyaD$	PTH_1700	+++	NT	NT
$\Delta hycH$	-	++	NT	NT
$\Delta hybD$	PTH_1700	-	+	+
$\Delta hycI$	-	-	NT	NT
$\Delta hypD$	PTH_1698	-	+++	-
$\Delta hybF$	-	++	NT	NT

NT: Not Tested

<引用文献>

- 1) Leng *et al.*, *Bioresour Technol* 247, 1095-1106 (2018)
- 2) Kosaka *et al.*, *J Bacteriol* 188, 202-210 (2006)
- 3) Kosaka *et al.*, *Genome Res* 18, 442-448 (2008)
- 4) Kato, Kosaka, Watanabe, *Microb Biotechnol* 2, 575-584 (2009)
- 5) Baba *et al.*, *Mol Syst Biol* 2, 2006.0008 (2006)
- 6) Shimoyama *et al.*, *FEMS Microbiol Lett* 270, 207-213 (2007)
- 7) Kosaka *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* 83, 1362-1371 (2019)
- 8) Hederstedt, Bergman, Jörnvall, *FEBS Lett* 213, 385-390 (1987)
- 9) McNeil *et al.*, *J Biol Chem* 287, 18418-18428 (2012)
- 10) Søndergaard, Pedersen, Greening, *Sci Rep* 6, 34212 (2016)
- 11) Lacasse *et al.*, *J Biol Chem* 294, 15373-15385 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosaka Tomoyuki, Tsushima Yuka, Shiota Yusuke, Ishiguchi Takayuki, Matsushita Kazuo, Matsutani Minenosuke, Yamada Mamoru	4. 巻 38
2. 論文標題 Membrane Potential-requiring Succinate Dehydrogenase Constitutes the Key to Propionate Oxidation and Is Unique to Syntrophic Propionate-oxidizing Bacteria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.me22111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩田悠介, 高坂智之
2. 発表標題 異種発現によるグラム陽性細菌コハク酸脱水素酵素のFAD共有結合機構の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高坂 智之, 松谷 峰之介
2. 発表標題 ゲノム情報解析による遺伝子の機能に関する遺伝子群の抽出と可視化
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢原 拓弥, 高坂 智之
2. 発表標題 大腸菌での異種ギ酸トランスポーターのギ酸取り込み能の機能解析法の検討とその適応
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 塩田 悠介, 高坂 智之
2. 発表標題 大腸菌における異種コハク酸脱水素酵素の発現と機能化の比較
3. 学会等名 第74回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosaka Tomoyuki
2. 発表標題 Examples of Artificial Intelligence (AI)-used collaborative research by microbiologist
3. 学会等名 The 7th Priority University Seminar for Cooperation in Thailand between Chulalongkorn University, Kasetsart University and Yamaguchi University (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松谷 峰之介 (Matsutani Minenosuke) (70380558)	東京農業大学・その他部局等・准教授 (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------