

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05351

研究課題名(和文)パラベンを輸送するペプチドABCトランスポーターホモログの構造と機能柔軟性の解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of a peptide ABC transporter for paraben

研究代表者

矢嶋 俊介(Yajima, Shunsuke)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：90301548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Microbacterium hydrocarbonoxydansにおいて非天然のヒドラジド化合物代謝を担うオペロンは、トランスポーター、分解酵素を含む。当該菌の生育実験、オペロン遺伝子発現解析、酵素活性解析から、当該菌が天然基質としてパラベンを代謝できることを明らかにした。さらに、そのホモログ酵素を別の放線菌から単離、機能およびX線結晶構造解析を行った。ホモログもパラベンを基質としたものの、両者の活性に違いが見られ、その要因として活性部位の入り口の構造の違いが考えられた。一方で、パラベンを取り込むトランスポーターの構造解析については、組換え蛋白質の取得にさらなる検討が必要となる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物を資化する仕組みにおいてトランスポーターと分解酵素の役割は重要であるが、データベースの情報のみでは、本来の基質を正確に予測することは容易ではない。今回、立体構造解析等をもとにパラベンを代謝する最初の段階の仕組みを明らかにした。パラベンは化粧品や食品の保存料として使われている一方、内分泌系への懸念もいわれる。またパラベンが植物体の構成成分として存在するという報告もある。パラベンを触媒する蛋白質、また資化する菌は本研究が初めての報告であり、分子レベルでは蛋白質機能解析に新たな知見を加えた点、微生物としてはバイオレメディエーションへの応用などが考えられる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that parabens are natural substrates for hydrazidase, which is isolated from Microbacterium hydrocarbonoxydans grown with hydrazide compounds as sole carbon source. Growth experiments and gene expression analysis of the bacteria also indicated that parabens are catabolized by the bacteria. Furthermore, a homologue of the enzyme was isolated from another actinomycete, and its function and structure were analyzed. Although the homologue also catalyzed parabens as substrates, differences were observed in the activity of the two enzymes, which was attributed to structural differences in the entrance region of the active sites. On the other hand, the analysis of the transporter that takes up parabens requires further investigation to obtain the recombinant protein.

研究分野：蛋白質科学

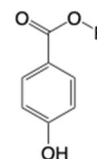
キーワード：基質認識 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターは細胞膜に存在し、細胞内外間の物質輸送を担う蛋白質である。ヒトでは疾患や免疫との関連から注目されている。細菌においても多剤耐性の要因として、また栄養を取り込むなど、増殖において非常に重要な役割を果たしていることから、基本的な生命現象を担う機能分子として注目され研究が進んでいる。細菌由来の ABC トランスポーターはインポーターとして Type I, II が、エクスポーターとして B-family が知られている。どの蛋白質も膜貫通サブユニット(TMS)と ATP 結合サブユニット(NBS)からなり、Type I, II では加えて基質結合サブユニット(SBS)が必要であり、B-family では TMS と NBS が融合しドメイン構成をとっている。

研究対象である *Microbacterium hydrocarbonoxydans* は、非天然物である 4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH) を唯一の炭素源として生育可能である。現在までの解析から、HBPHはトランスポーターにより取り込まれ、hydrazidase によって分解され生じる 4-hydroxybenzoic acid (4-HB)が代謝経路に入ると考えている。これらの遺伝子はオペロンを構成し、そこに含まれる転写因子である IclR が 4-HB の結合により、オペロン遺伝子発現を制御すると予想している。

この ABC トランスポーターは相同性検索により Type I インポーターである (di)oligopeptide/nickel transporter とアノテーションされる。このトランスポーターが peptide を取り込み、amidase ファミリーに属する hydrazidase が peptide を加水分解する、という流れが想定されるが、hydrazidase はペプチドではなく、パラベン(4-hydroxybenzoate alkyl) (右図) に対する esterase 活性を示し、かつ SBS との複合体構造も得られたことから、このトランスポーターの天然基質は植物中に存在が報告されているパラベンである可能性が想定された。



パラベンの構造。R 部分はアルキル基。

2. 研究の目的

Hydrazidase、ABC トランスポーターの各サブユニット、それぞれの遺伝子は、転写因子 IclR の下流に位置しオペロンを構成している。パラベンを輸送するトランスポーターは報告が無く、一方で相同性検索から、このオペロンは大腸菌や枯草菌などには見られないが、複数の放線菌門に存在し、その中の hydrazidase ホモログには、hydrazidase の立体構造解析で明らかとなった基質特異性決定アミノ酸残基が保存されている。

本研究は、当該オペロンを構成する hydrazidase や ABC トランスポーターの構造を含めた機能解析を通して、これらの遺伝子がパラベンを資化するために機能していることを明らかにすることを旨とする。近年の細菌のゲノム情報の蓄積はめざましいが、配列相同性のみでアノテーションされ見落とされていた蛋白質の新規構造機能を明らかにすることで、in silico 解析の精度向上に寄与する。また、このオペロンの細菌における生理的意義を明らかにすることができるようになると思う。

3. 研究の方法

(1) トランスポーターの組換え体蛋白質の取得

トランスポーターの構造解析を行うために、目的蛋白質の発現系構築を目指した。大腸菌を用い、発現系構築の段階では C 末端に GFP を接続、発現の可否が緑色蛍光で確認できる。また、in vitro での転写-翻訳系を用いた発現系の構築も試みた。

(2) Hydrazidase の kinetic 解析

M. hydrocarbonoxydans 由来 hydrazidase がパラベンを基質とするかどうか、詳細に検討するため、kinetic parameters を求めた。基質としてメチル、プロピル、ブチルの 3 種のパラベンと、コントロールとして HBPH を用いた。Hydrazidase は NAD⁺ を補酵素として使用することから波長 340 nm の吸光値を測定し、Lineweaver-Burk プロットによりパラメーターを算出した。

(3) *M. hydrocarbonoxydans* の生育解析とオペロン遺伝子発現解析

パラベンが天然基質として当該オペロンが代謝に関わっていることを想定し、パラベンを唯一の炭素源とした最小培地を用いて、当該細菌の生育実験を行った。ポジティブコントロールとして glucose、ネガティブコントロールとしてパラベンを溶かす DMSO を用いた。また、想定しているオペロン機能として、基質分解により生成した 4-HB がオペロン中の遺伝子発現を誘導する点がある。そこで、最小培地で培養した菌体から RNA を調製し、RT-qPCR 法により、オペロン中の遺伝子がパラベンにより発現誘導されるかどうかを確認した。

(4) *Pseudonocardia acaciae* 由来 hydrazidase ホモログの機能構造解析

当該オペロンのホモログをもつ放線菌を確認している。そのうちの *P. acaciae* から amidase をクローニングし hydrazidase と同様の機能をもつかどうか、kinetic 解析と X 線結晶構造解析を

行った。

4. 研究成果

(1) トランスポーターの組換え蛋白質の取得

トランスポーターの N 末端に His x 6-tag を融合した組換え蛋白質の発現を試みた。発現量の有無の確認が明確にできなかったため、C 末端に GFP を融合したコンストラクトを作成した。IPTG により発現誘導した培養菌体から、SDS-PAGE 上で緑色のバンドが薄く確認されたが、目的の分子量の位置と異なること、再現性が不安定であり組換え蛋白質の取得にいたらなかった。また、in vitro 系を用いた発現系構築においても、明確な蛋白質発現を見いだすに至らなかった。

(2) Hydrazidase の kinetics 解析

M. hydrocarbonoxydans 由来 hydrazidase を大腸菌を用い組換え蛋白質として取得した。基質のメチル (MP)、プロピル (PP)、ブチルパラベン (BP)、HBPH は DMSO に溶解した。その結果、HBPH に対する K_m が $65 \mu\text{M}$ であるのに対し、MP, PP, BP ではそれぞれ $600, 1300, 600 \mu\text{M}$ と大きい値となった。 k_{cat} は HBPH の $8.5 \times 10^3/\text{s}$ に対し、MP, PP, BP では $1.2 \times 10^4, 8.7 \times 10^3, 1.1 \times 10^4/\text{s}$ であった。そのため、 k_{cat}/K_m は HBPH がパラベンに対し、5~20 倍の効率となった。Hydrazidase はパラベンよりも HBPH を効率よく触媒する結果となったが、MP, BP の K_m 値が 0.6 mM であったことから、hydrazidase の基質になると考えられた。

(3) *M. hydrocarbonoxydans* の生育解析とオペロン遺伝子発現解析

パラベンが hydrazidase の天然基質となり、当該オペロンがパラベン資化の初期段階を担っているかどうかを検証するために、最小培地の炭素源としてパラベンを用い、生育実験を行った。その結果、glucose を単一炭素源とした場合よりも生育は遅かったが、明らかな生育を示した。また、パラベンの溶媒として用いた DMSO を炭素源とした場合には生育が見られなかった。このことから、*M. hydrocarbonoxydans* はパラベンを取り込み炭素源として生育できることが明らかとなった。

このオペロンに含まれる IclR 様転写因子は、低分子化合物を結合することで DNA への結合状態を変化させ、オペロン中の遺伝子発現制御を行う一分子センサー型の転写因子である。そこで、パラベンを唯一の炭素源とした生育条件における、オペロン遺伝子の発現量解析を RT-qPCR により行った。その結果、グルコースを唯一の炭素源として培養した場合と比較して、IclR 様転写因子の発現量に変化は見られなかったが、hydrazidase およびトランスポーターサブユニットの各遺伝子の発現量が大きく上昇していた。特に、細胞外で基質補足に働く sbs 遺伝子は約 60 倍の発現量上昇を示しており、多くの基質を補足することに寄与することが考えられた。

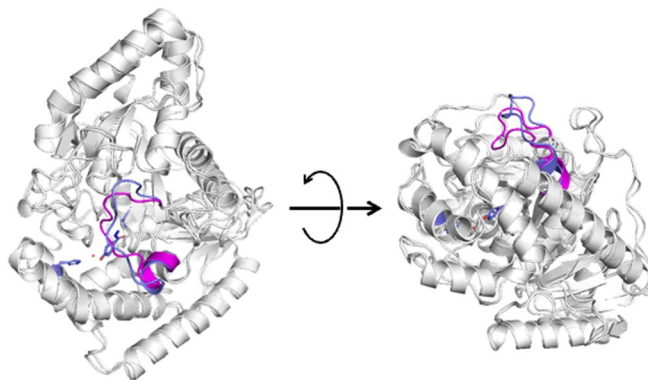
(4) *P. acaciae* 由来 hydrazidase ホモログの機能構造解析

データベース解析により *M. hydrocarbonoxydans* の当該オペロンは複数の放線菌にホモログが存在することを確認している。その中で *P. acaciae* の hydrazidase ホモログをクローニングし、kinetic 解析と X 線結晶構造解析を行った。

Kinetic 解析では、HBPH に対する K_m が $142 \mu\text{M}$ であるのに対し、MP, PP, BP ではそれぞれ $48, 51, 19 \mu\text{M}$ と小さい値となった。 k_{cat} は HBPH の $1.2 \times 10^3/\text{s}$ に対し、MP, PP, BP では $6.0 \times 10^2, 5.8 \times 10^2, 4.1 \times 10^2/\text{s}$ であった。そのため、 k_{cat}/K_m は HBPH がパラベンに対し、約 50% の効率となった。この結果は *M. hydrocarbonoxydans* hydrazidase の活性と異なる傾向の結果であったことから、その要因の解明を目指しホモログの X 線結晶構造解析を行った。得られた結晶の空間群は $I4_1$ であり、非対称単位中に 4 分子存在した。Hydrazidase の構造をターゲットとして分子置換

法により *P. acaciae* の hydrazidase ホモログの構造を 3 \AA 分解能で明らかにした (PDB ID: 8XAC)。

Hydrazidase とホモログの構造を Chimera により重ね合わせを行ったところ、両者のアミノ酸配列 identity が 58% であることを反映し、全体に非常によく一致しており RMSD 値は 0.95 \AA であった。一方で、活性部位の入り口付近のループ領域で両者の構造に違いが見られた。この領域は両蛋白質のアミノ酸配列も異なる部分である。Hydrazidase では活性部位の入り口を少し塞ぐような位置にあるが、ホモログのループ領域は hydrazidase のそれよりも下に位置し、さらに活性部位の入り口を塞



Hydrazidase (青)と *P. acaciae* 由来 hydrazidase ホモログ (マゼンタ) の立体構造の重ね合わせ図。活性部位の入り口のループ部分のみ色をつけている。

ぐような構造を取っていた。これはHBPHについてみると、hydrazidaseの活性部位を大きく開くことで大きい分子でも入りやすい構造になっていると考えられる。一方で、より小さいパラベンにはさらに活性部位に入りやすいと想定されるが、周囲のアミノ酸の配置から結合には不利になっている可能性が考えられた。一方、活性部位を塞がれているホモログでは、小さいパラベンは活性部位に入りやすいがHBPHは入りにくい状態であることが考えられた。

本研究ではパラベンを代謝すると予想されるオペロンについて、トランスポーターと分解酵素に焦点をあてた。トランスポーターについては種々の方法を試みたものの、十分な組換え蛋白質の取得に至らなかった。しかしながら、パラベンによりオペロン遺伝子の発現が強く誘導されること、特に菌体外の基質を捕獲するSBS遺伝子の発現増加率が最も大きかったこと、オペロン中の分解酵素のhydrazidaseについてはパラベンを基質にできることから、このトランスポーターがパラベン輸送を行うことを強く示唆する結果を得た。またオペロンを有する当該菌もパラベンを唯一の炭素源として生育可能であり、オペロン遺伝子発現の誘導と合わせ、当該菌が天然基質としてパラベンを利用することも強く示唆された。さらに、*P. acaciae*由来のhydrazidaseホモログについてもパラベン分解活性を示すことを明らかにした。

パラベンを分解する酵素として真菌由来cutinaseが報告されているが、hydrazidaseとの配列相同性は無く、また生理的な役割等その詳細についての報告は無い。また、パラベンを唯一の炭素源として生育可能な細菌は本研究が初めての報告となる。

パラベンは、化粧品や食品の保存料として使われているが、植物の細胞壁成分として自然界にも存在することが報告されている。放線菌は通常土壌細菌であることから、植物が枯れて土壌に触れることにより自然界のパラベンを得る機会になると考えられた。一方で、hydrazidaseとそのホモログではkinetic解析で同一の結果とはならなかったことから、パラベン以外にも天然の基質が存在する可能性が考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Mihoko Takenoya, Yoshiaki Hiratsuka, Kaho Shimanura, Shinsaku Ito, Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterizing an amidase and its operon from actinomycete bacteria responsible for paraben catabolism	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	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） 10.1093/bbb/zbae083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹野谷 美穂子、平塚 孔章、伊藤 晋作、佐々木 康幸、矢嶋 俊介
2. 発表標題 人工ヒドロラジド分解活性をもつPseudonocardia acaciae由来Amidaseの天然基質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹野谷 美穂子、伊藤 晋作、佐々木 康幸、矢嶋 俊介
2. 発表標題 放線菌由来hydrazidaseのパラベン分解活性に関する解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------