

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580077

研究課題名（和文）新規芳香族酸トランスポーターの解明と次世代有用ポリマー原料生産への応用

研究課題名（英文）Characterization of a novel tripartite aromatic acids transporter, and its application for the production of industrially valuable metabolites

研究代表者

政井 英司（MASAI EIJI）

長岡技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：20272867

研究成果の概要（和文）：フタル酸類分解菌 *Comamonas* sp. E6 株によるテレフタル酸（TPA）の細胞内取り込みに、tripartite tricarboxylate transporter（TTT）と類似する新規のトランスポーターが関与することを明らかにした。本トランスポーターは、TPA 結合タンパク質 TphC、大膜タンパク質成分 TpiA および小膜タンパク質成分 TpiB から構成される。また本トランスポーターは、プロトン駆動力をエネルギーとして要求することが示された。

研究成果の概要（英文）：This study identified a novel type of aromatic acids transporter involved in terephthalate（TPA）uptake by *Comamonas* sp. strain E6. The TPA transporter is similar to the tripartite tricarboxylate transporter（TTT），and consists of the TpiA-TpiB membrane components and TPA-binding TphC. TPA uptake by E6 cells was completely inhibited by a protonophore, indicating that the TPA uptake system requires a proton motive force.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：フタル酸類、テレフタル酸、*Comamonas* 属細菌、基質取り込み、有用物質生産、生分解性ポリマー

1. 研究開始当初の背景

プロトカテック酸（PCA）の微生物代謝中間体である 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸（PDC）は、強力なエポキシ接着剤を初めとした生分解性・高機能性ポリマーの原料となる有用化合物である。PDC は未利用木質系バイオマスであるリグニンの酸化分解物から生産することが可能であることから、PDC を経由したリグニンの有効利用が期待されている。しか

し現時点では PDC を大量かつ安価に生産する方法がなく、PDC ポリマーの開発に支障をきたしている。PDC の化学合成は困難であるが、細菌の代謝系を用いて安価なテレフタル酸（TPA）から生産することができる。TPA 分解菌 *Comamonas* sp. E6 株は、TPA を 2 段階の反応で PCA へと変換し、さらに PCA 4,5-開裂系で分解する。E6 株の TPA から PDC への変換系遺伝子を異種宿主で発現

させたところ、酵素遺伝子は発現するものの TPA の変換がほとんど見られず、TPA の細胞内取り込みが障壁となっていることが示唆された。

E6 株の TPA 分解オペロン (*tphCA2A3BA1*) の内、*tphA2A3BA1* は、TPA の PCA への変換に関与する。一方、*tphC* は tripartite tricarboxylate transporter (TTT) に類似した基質結合タンパク質をコードすることが示唆され、E6 株において TPA は、芳香族化合物の輸送では例のない TTT 様システムによって取り込まれることが推定された。

2. 研究の目的

TPA の微生物変換の障壁となっている TPA の細胞内取り込み機構を明らかにするために、TphC と相互作用する TTT 様の膜タンパク質成分遺伝子を同定し、機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 取り込みアッセイ E6 株とその変異株を 10 mM コハク酸または 10 mM コハク酸 + 10 mM TPA を含む最少培地で培養した。得られた菌体を 50 mM Tris-MES buffer (pH 7.5) で洗浄後、650 μ l の反応系に OD₆₀₀ が 2.0 の菌体と 20 μ M [carboxy-¹⁴C]TPA (60 mCi/mmol) を添加して、経時的に反応液をサンプリングした。菌体に取り込まれた [¹⁴C]TPA 量は液体シンチレーションカウンターで測定した。

クエン酸の取り込みは、E6 株とその変異株を 10 mM コハク酸または 10 mM コハク酸 + 10 mM クエン酸を含む最少培地で培養した菌体と 20 μ M [1,5-¹⁴C]クエン酸 (55 mCi/mmol) を用いて測定した。

(2) 遺伝子のクローニング E6 株の *tctA* ホモログを単離するために、ゲノム既知の *Comamonas testosteroni* KF-1 株、*Delftia acidovorans* SPH-1 株、*Acidovorax* sp. JS42 株の *tctA* ホモログにおいて保存された領域を用いて PCR プライマーを設計した。得られた 2 つの異なる PCR 増幅産物をプローブに用いて、コロニーハイブリダイゼーションによって E6 株から *tctA* ホモログを含む DNA 断片を取得し、これら DNA 断片の塩基配列を決定した。

(3) 遺伝子破壊株の作製 E6 株の *tctA* 破壊株、*tpiA* 破壊株、および *tpiB* 破壊株を作製するために、それぞれの遺伝子内部にカナマ

イシン耐性遺伝子を挿入した DNA 断片を調製し、pK18*mobsacB* または pK19*mobsacB* に導入したプラスミドを得た。各遺伝子破壊用プラスミドをエレクトロポレーションによって E6 株に導入し、相同組換えによって目的遺伝子が破壊された株を単離した。遺伝子破壊の確認はサザンハイブリダイゼーション解析によって行った。*tpiA* 破壊株の相補用プラスミドは、*tpiA* を含む DNA 断片を pJB866 に導入して作製した。

(4) *Pseudomonas putida* における *tpiBA*、*tphC* および TPA 代謝系遺伝子の発現 pJB866 に *tphC* と *tpiBA* を連結した pJCBA、*tpiBA* と TPA 代謝系遺伝子群 (*tphA2A3BA1*) を連結した pJBAtG、*tphC* と *tphA2A3BA1* を連結した pJCtG、および *tpiBA*、*tphC*、*tphA2A3BA1* を連結した pJCBAAtG の 4 種のプラスミドを作製した。これらプラスミドを *P. putida* PpY1100 株にエレクトロポレーションで導入し、各形質転換体を得た。各形質転換体の休止細胞と細胞抽出液を調製し、それぞれの TPA 変換能を高速液体クロマトグラフィー-マススペクトロメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1) *Comamonas* sp. E6 株による TPA の取り込み能を調べるために、10 mM コハク酸または 10 mM TPA を添加した最少培地で E6 株を培養し、[carboxy-¹⁴C]TPA を用いて、菌体内に取り込まれた TPA 量を測定した。その結果、TPA で培養した菌体のみ TPA の取り込み活性が観察されたことから、TPA トランスポーター遺伝子の少なくとも一部は TPA での培養時に発現が誘導されることが示された (図 1)。また TPA の取り込みは、pH 7.5 で最大の活性 (2.6 nmol/mg of protein·min) を示した。

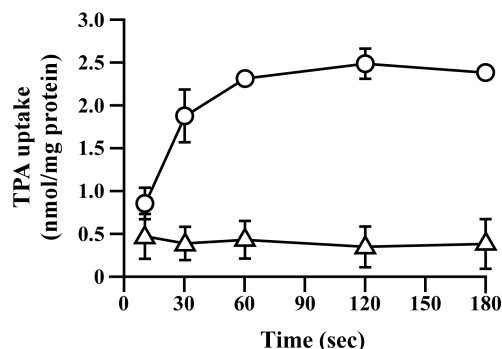


図 1. *Comamonas* sp. E6 株細胞による [¹⁴C]TPA の取り込み。TPA 存在下 (○) または非存在下 (△) で培養した E6 株細胞による TPA の取り込みを示す。

TPA の輸送に必要なエネルギーを明らかにするために、プロトンフォアである *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) と ATPase の阻害剤である 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) でそれぞれ処理した E6 細胞を用いて TPA 取り込み能を調べた。その結果、DCCD 処理した菌体は野生株と同等の TPA 取り込み能を示したのに対し、CCCP 処理細胞では TPA の取り込み能が完全に失われた。以上の結果から、E6 株における TPA の取り込みはプロトン駆動力に依存していることが明らかとなった。

(2) TPA トランスポーターの膜タンパク質成分をコードする遺伝子を単離するために、E6 株と近縁でゲノム既知の *Comamonas testosteroni* KF-1 株のゲノム配列中に TTT ファミリーに属するクエン酸トランスポーターの大膜タンパク質成分をコードする *tctA* のホモログが存在するかを調べた。その結果、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium の *tctA* と 39% の同一性を示す 2 つの機能未知遺伝子を見出した。これらの遺伝子配列を基に E6 株から 2 つの *tctA* ホモログを含む 8.9-kb EcoRI 断片と 7.6-kb EcoRI 断片を単離した。得られた DNA 断片の塩基配列を決定したところ、8.9-kb EcoRI 断片中には、クエン酸結合タンパク質をコードする *tctC*、TTT の大膜および小膜タンパク質成分をコードする *tctA*、*tctB* と相同性のある遺伝子が *tctCBA* の順で存在した (図 2)。またこれら遺伝子の直上流には、*tctCBA* とは異なる転写方向で二成分制御系をコードする *tctDE* が存在した (図 2)。一方、7.6-kb EcoRI 断片中には *tctBA* と相同性のある遺伝子が存在し、本遺伝子を *tpiBA* と命名した (図 2)。また *tpiBA* の周辺には基質結合タンパク質をコードすると推定される遺伝子は存在しなかった。

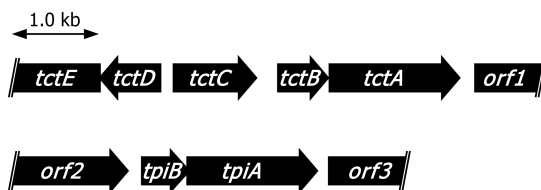


図 2. *Comamonas* sp. E6 株の *tctCBA* と *tpiBA* 周辺の遺伝子地図。

(3) *tctCBA* の機能を明らかにするために、E6 株の *tctA* を相同組換えによって破壊した。得られた *tctA* 破壊株の TPA 生育能は野生株と差異はなく、野生株と同等の TPA 取り込み能を示したことから、*tctA* は TPA の取り込みには関与しないことが示された。しかし、

tctA 破壊株はクエン酸での生育能を失っていることが判明した。[1,5-¹⁴C]クエン酸を用いた E6 株による取り込み実験を行ったところ、クエン酸の取り込みは、クエン酸で生育した E6 細胞でのみ観察された (図 3)。このことからクエン酸のトランスポーター遺伝子の発現がクエン酸での生育下で誘導されることが示された。クエン酸存在下で生育した *tctA* 破壊株のクエン酸取り込み能を調べた結果、本破壊株はクエン酸の取り込み能を失っていることが明らかとなった (図 3)。以上の結果より、*tctCBA* は E6 株において、クエン酸トランスポーターとして機能していることが強く示唆された。またこれらの遺伝子の転写が *tctDE* にコードされる二成分制御系によって制御されていることが推定された。

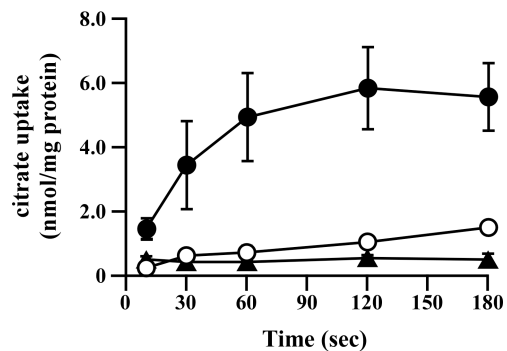


図 3. *Comamonas* sp. E6 株細胞および *tctA* 破壊株細胞による [¹⁴C]クエン酸の取り込み。クエン酸存在下 (●) または非存在下 (○) で培養した E6 株細胞、およびクエン酸存在下で培養した *tctA* 破壊株細胞 (▲) によるクエン酸の取り込みを示す。

(4) E6 株による TPA の取り込みに *tpiBA* が関与するかを調べるために、E6 株の *tpiA* 破壊株と *tpiB* 破壊株を作製した。*tpiA* 破壊株は TPA での生育能を完全に失っていた (図 4)。

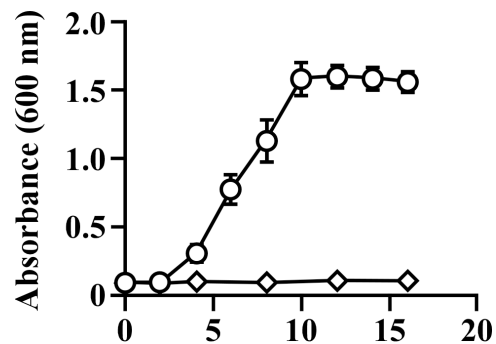


図 4. *Comamonas* sp. E6 株と *tpiA* 破壊株の TPA における生育能。E6 株 (○) と *tpiA* 破壊株 (◇) を 10 mM TPA を含む最少培地で培養した。

また *tpiA* を持つプラスミドを *tpiA* 破壊株に導入した結果、TPA での生育能が回復したことから、TPA での生育に *tpiA* が必須であることが明らかとなった。同様に *tpiB* 破壊株も TPA での生育能を失ったことから、*tpiB* も TPA での生育能に必須であることが示された。

tpiA の破壊による TPA での生育能の欠損が TPA の取り込み能の欠損によるかを調べるために、*tpiA* 破壊株の TPA 取り込み能を測定した。その結果、*tpiA* 破壊株は TPA 取り込み能を失っており (図 5)、*tpiA* を持つプラスミドを導入した破壊株において TPA 取り込み能の回復が見られた (図 5)。また *tpiB* 破壊株においても TPA の取り込み能が見られなかった。以上の結果から、TPA の取り込みに *tpiA* および *tpiB* が必須であることが明らかとなった。

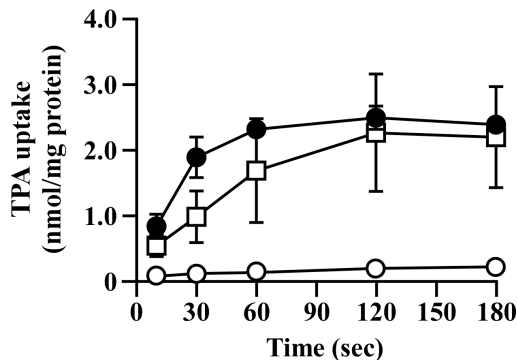


図 5. *Comamonas* sp. E6 株細胞および *tpiA* 破壊株細胞による $[^{14}C]$ TPA の取り込み。TPA 存在下で培養した E6 株細胞 (●), *tpiA* 破壊株 (○), *tpiA* 破壊株に *tpiA* をプラスミドで導入した株 (□) による TPA の取り込みを示す。

(5) *tpiA* 破壊株および *tpiB* 破壊株の TPA 以外の芳香族酸での生育能を調べた結果、イソフタル酸 (IPA) での生育能が失われていた。またフタル酸 (OPA) およびプロトカテク酸 (PCA) での生育が顕著に遅延することが示された。IPA の取り込みには、IPA 代謝オペロン *iphACBDR* 中に存在する *iphC* が *tphC* と同様に TTT 様の基質結合タンパク質をコードしており、IPA での正常な生育に必須の遺伝子であることが示されている。したがって *tpiBA* の遺伝子産物である TpiA-TpiB 膜タンパク質成分は、TphC 以外に IphC とも相互作用することで IPA の取り込みに関与していることが強く示唆された。さらに TpiA-TpiB 膜タンパク質成分は、未同定の OPA および PCA の基質結合タンパク質とも相互作用して、これら基質の取り込みに働くことが推定された。

(6) E6 株の TPA トランスポーターが TPA 結合タンパク質 TphC と TpiA-TpiB 膜タンパク質成分で構成されていることを調べるために、TPA 変換能を持たない *Pseudomonas putida* PpY1100 株に *tphC* および *tpiBA* を TPA 変換系遺伝子 *tphA2A3BA1* とともにプラスミドで導入することによって、PpY1100 株が TPA 変換能を獲得するかを調べた。はじめに *tphC* と *tphA2A3BA1* を導入した PpY1100 株の休止細胞による TPA 変換能を調べたところ、TPA の変換能は見られなかった。しかし、同形質転換体の細胞抽出液には TPA の変換能が観察されたことから、*tphA2A3BA1* を持つ PpY1100 株に *tphC* だけを導入した場合には、TPA の取り込み能はないことが示唆された。同様に *tpiBA* と *tphA2A3BA1* を導入した PpY1100 株の細胞抽出液には TPA 変換活性が認められたが、同形質転換体の休止細胞には TPA 変換活性は見られなかった。一方、*tphA2A3BA1* に加えて *tphC* と *tpiBA* の両者を導入した PpY1100 株の休止細胞においては顕著な TPA 変換活性が検出された。以上の結果から、E6 株の TPA トランスポーターは、TPA 結合タンパク質 TphC と TpiA-TpiB 膜タンパク質成分から構成されると結論された。

(7) 本研究では、*Comamonas* sp. E6 株の TPA 取り込みに働く新規の TTT 様システムを明らかにした。得られた結果は、芳香族カルボン酸の取り込みに TTT 様システムが関与することを初めて示すものである。

これまでに *Bordetella* 属細菌や *Cupriavidus* 属細菌等のある種の β -プロテオバクテリアのゲノムにおいて 78~181 個というきわめて多数の基質結合タンパク質遺伝子のホモログが存在することが報告されている。それに対して、これらゲノム中には 2~5 個の膜タンパク質成分遺伝子しか存在しないことから、少数の膜タンパク質成分が多数の基質結合タンパク質と相互作用することによって様々な基質の取り込みを行っていることが推定されている。本研究では、*tpiBA* が TPA だけではなく、IPA、OPA、PCA の取り込みに関与することが示唆され、一つの膜タンパク質成分が複数の基質の取り込みに実際に関与することが示唆された。

加えて、本研究では異種宿主である *P. putida* において *tphA2A3BA1* とともに *tpiBA* および *tphC* を発現させることによって、休止細胞に TPA 変換能を付与することに成功した。これらの知見は TPA からの高効率な有用物質生産系を構築する上で重要な基盤になると考えられる。

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)

[学会発表] (計2件)

① 政井英司、他、*Comamonas* sp. E6株における新規芳香族カルボン酸トランスポーターの解析、日本農芸化学会大会、2012年3月23日、京都

② 政井英司、他、*Comamonas* sp. E6株のテレフタル酸取り込みシステム、日本農芸化学会大会、2011年3月27日、京都

[その他]

ホームページ等

<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-l/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

政井 英司 (MASAI EIJI)

長岡技術科学大学工学部・教授

研究者番号：20272867