

## 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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658108

研究課題名（和文） 微生物物質生産の飛躍的増強を目指す輸送体分子制御技術基盤の創成

研究課題名（英文） Development of transporter-control technology for fermentation

研究代表者

阿部 敬悦 (ABE KIETSU)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50312624

研究成果の概要（和文）：微生物発酵生産では、細胞内外の基質・産物の取り込み排出制御が残された大きな未開拓領域である。輸送体の基質特異性及び輸送の方向性（取り込み・排出）を制御する新技術を開発するために、工業細菌のアスパラギン酸：アラニン交換輸送体 AspT をモデルに、輸送の速度論的解析、基質結合部位の特定、基質特異性の改変を行った。さらに交換輸送体から排出輸送体への人為的改変を試みた。

研究成果の概要（英文）：*Tetragenococcus halophilus* AspT catalyzes the electrogenic exchange of L-aspartate<sup>1-</sup> with L-alanine<sup>0</sup>. We show that the binding sites of L-aspartate and L-alanine are independently present in AspT by means of the kinetic analyses and mutant analyses. Single-cysteine variants of transmembrane 3 of AspT revealed that TM3 was the translocation pathway for L-aspartate and that some mutants lost L-aspartate transport activities but still catalyzed L-alanine and L-serine transport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：代謝工学・輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 発酵生産と輸送体解析の必要性

微生物発酵(アミノ酸・核酸)は細胞内代謝の強化改変により成功を収めたが、現在では基質輸送・産物排出が律速である。産業菌のグルタミン酸排出系が遺伝学的に同定されたのですら最近であり(Nakamura ら AEM 73:4491, 2007)、生化学的解析例は極めて少ない。遺伝子が輸送体をコードすると推定されても、遺伝学及び生化学的解析無しには輸

送基質の推定は殆ど出来ない(Baraborde ら BBA1758:1557 2006)。膜蛋白質である輸送体は生化学的取扱いが困難で、結晶解析も 60 例以下である。世界的に、輸送能強化による生産性の限界打破が重要課題となるが、輸送体生化学情報の不足から、輸送体を改変制御して物質生産を行う技術は実現していない。

(2) 発酵用高効率輸送体モデルとしての交換輸送体 AspT

一般に物質の輸送過程はエネルギーを消費

することから、我々は、発酵生産に極めて有効な輸送体として、輸送過程でエネルギーを消費せずにエネルギーを生産しつつ物質生産を高効率に行う反応と輸送体の探索を行い、アスパラギン酸(Asp)：アラニン(Ala)変換系<sup>1,2)</sup>を世界で初めて発見し、生化学解析から産業応用を行ってきた<sup>3)</sup>。本反応は、基質(Asp)：産物(Ala)交換輸送体 AspT により触媒される。AspT は最速の輸送体に属し、高効率反応の中核を成す<sup>3)</sup>。我々は工業用 Asp:Ala 変換乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の AspT を単離し<sup>2)</sup>、生化学的構造解析から、膜貫通領域(10 回貫通型)・輸送体初の輸送制御領域(TrkA\_C ドメイン)<sup>4)</sup>、基質透過膜貫通領域 TMIII<sup>5)</sup>を同定した。現在、人工膜小胞を用いた精製 AspT の輸送解析から、(i)AspT の Km は取込み基質 Asp Km=0.3mM、排出基質 Ala Km=30mM と 100 倍の差を示すこと(次頁図 4 左)、(ii)Asp アナログ L-システイン硫酸との阻害解析から、Asp 輸送への Ki=0.5mM、Ala 輸送への Ki=30mM が算出され、(i)(ii)から Asp と Ala の結合部位が異なることが推定された。

<参考文献>1)Abe ら J. Biol. Chem. 271:3079,1996 ;2) Abe ら J. Bacteriol. 184:2906,2002; 3)七谷,阿部 ハ インドガストリート インドネシア 66:442,2008; 4) Nanatani ら J. Bacteriol. 189:7089,2007; 5) Nanatani ら J. Bacteriol. 191:2122,2009

## 2. 研究の目的

微生物発酵生産では、細胞内外の基質・産物の取り込み排出制御が残された大きな未開拓領域である。本研究においては、輸送体の基質特異性及び輸送の方向性(取り込み・排出)を制御する新技術を開発するために、工業細菌のアスパラギン酸：アラニン交換輸送体 AspT をモデルに、基質特異性の改変、交換輸送体から取り込み専用輸送体および排出専用輸送体への人為的改変を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)AspT の基質結合部位の同定

① AspT の精製：これ迄に AspT-HisTag 体(野生型-N 末 HisX6 および single Cys 置換変異体-細胞質側ビッググループ HisX6)を精製に用いており<sup>4)</sup>。本研究でも、AspT 膜貫通領域 TMIII single Cys 置換変異体の HisTag 体を精製して解析に用いた。

②AspT の輸送活性の測定：輸送活性は、人工膜小胞に精製 AspT-HisTag 体を再構成して、放射性基質の取り込みにより測定した。小胞内に封入する非放射性基質との交換反応、小胞内外の緩衝液 pH 差・Na<sup>+</sup>濃度差に

よるプロトン駆動、Na<sup>+</sup>イオン駆動(取込みまたは排出反応)の輸送実験を行った<sup>4,5)</sup>。

③基質透過経路 TMIII の基質結合部位の解析：これまでの生化学的解析から、TMIII が膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスで基質透過経路を形成していることが推定されている<sup>4,5)</sup>。TMIII の変異体解析において、TMIII の細胞質側に面する部位(Water-filled pore)、TMIII が膜貫通領域でシールドされている部位(Hydrophobic core)に Asp 輸送活性が低下している残基が観察され、基質結合部位と推定された。これらの変異体を中心 Ala の輸送活性を調べて、Asp,Ala の相対輸送活性が異なるアミノ酸残基を探索する。Asp 輸送能のみが落ちて、Ala 輸送能が低下しない部位を Asp 結合部位と推定する。その逆は Ala 結合部位と推定される。(AspT 野生型では、L-システイン硫酸による Asp 輸送、Ala 輸送の Ki 値が大きく異なり、Asp, Ala 結合部位の差を示唆する)。

### (2) AspT の基質結合部位改変

これまでの解析で L-システイン硫酸(CSA)が AspT の良好な競合阻害剤であることを確認している。そこで、AspT の基質 Asp, Ala の推定結合領域の変異改変により、AspT へ Cys 輸送能の付与を試みる。輸送が交換モードで起きるのか、プロトンまたはナトリウムイオン駆動で起きるのかも再構成系で判定する。

## 4. 研究成果

### (1) AspT の基質結合部位の同定

これまでの研究から AspT の第 3 膜貫通領域は、細菌の間で配列の保存性が高く、親水性残基に富み、変異体の解析から基質透過経路の一部であることが明らかになっている(Nanatani ら J. Bacteriol. 191:2122,2009)。阻害剤や各種アミノ酸による輸送の競合阻害解析の結果、Asp 輸送 と Ala 輸送 に対して異なる阻害度を示す、アミノ酸および阻害剤が存在することが判明し、Asp と Ala の基質結合部位が異なることが予想された(表 1, 2, 成果発表論文②)。以上の結果を基に、本研究では第 3 膜貫通領域およびその周辺領域のアミノ酸残基を Cysteine に置換した AspT 変異体を精製し、Asp と Ala の輸送の初速を比較した。その結果、Cysteine-less 体に対して Asp 輸送と Ala 輸送の間で輸送能の低下率の異なる変異体が見出された。特に TM3 の細胞質側に存在する親水性の高い領域では、Asp の輸送が大きく低下している残基が多くみられた(図 1)。この結果から TM3 は Asp の基質認識及び輸送に重要な役割を持つことが示唆された。

表1. アスパラギン酸およびアラニン異性体のAspTに対するキチンイグマパラメータ

	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ ]	$V_{max}/K_m$
L-Asp	0.35 ± 0.03	175 ± 21	500
L-Ala	26 ± 2	155 ± 9	6.0
D-Asp	0.098 ± 0.000	3.8 ± 0.3	39
D-Ala	3.3 ± 0.2	3.3 ± 0.4	1.0

表2. L-Cys, L-Ser, L-Asp アナログのAspTに対する $K_i$ 値

	L-Asp self-exchange		L-Ala self-exchange	
	$K_i$ [mM]	$IC_{50}$ [mM]	$K_i$ [mM]	$IC_{50}$ [mM]
L-cysteine	2.0 ± 0.2	8.9	20 ± 2.7	65
L-serine	N.D.*	N.D.*	5.3 ± 1.7	28
L-CSA	0.59 ± 0.08	0.83	28 ± 0	28
L-CA	0.29 ± 0.05	0.47	14 ± 0	16
D-CA	0.14 ± 0.02	0.19	5.0 ± 0.2	9.0

\*N.D.: L-Ser の L-Asp 輸送に対する $K_i$ 値は大きすぎて決定できなかった。

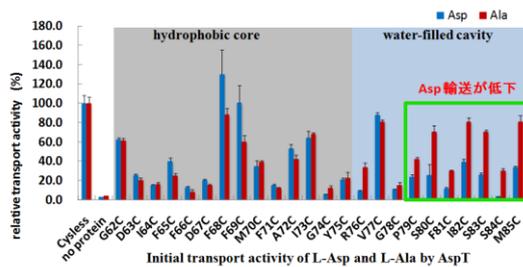


図1. TM3のsingle-Cys置換変異体のAsp輸送活性(青)とAla輸送活性(赤)

## (2) AspTの基質結合部位改変

AspTのTM3変異体のうち、R76, S80, S83, S84変異体では野生型に対してAsp輸送活性の著しい低下が認められたのに対して、Ala輸送活性の低下が殆どなく、TM3はAspの結合サイトであることが示唆された。さらにこの結果は、Alaの結合サイトがAspの結合サイトと独立して存在することを示している。Aspの基質アナログ阻害剤であるL-cysteinesulfinic acid、L-cysteic acidがTM3変異体のAla輸送を阻害しにくいことから指示される(表2)。

AspTのTM3変異体のうち、TM3開口部の変異体では野生型に対してAsp及びL-システイン(Cys)への特異性を失い、AlaおよびL-セリンへの輸送能を有する変異体を同定した。変異体の解析ではイオン共役が変化したものは無かったが、輸送モードが交換体から排出体に変化した変異体の存在が示唆された。更に、TM3の蛍光修飾解析から(図2)、TM3はAsp結合型構造、Ala基質結合型構造、基質非結合型構造の3つ状態を取ることが明らかになった。

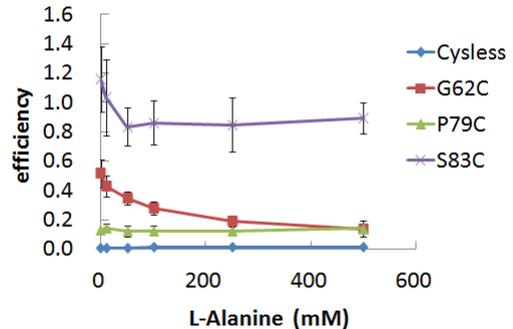
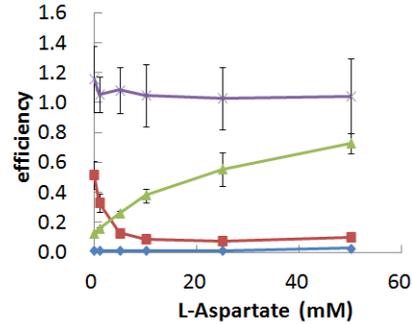


図2. AspT-single Cys変異体のAsp, Ala存在下でのOGM蛍光修飾率の差—G62Cは基質非存在下で蛍光修飾され、P79CはAsp存在下で蛍光修飾されるがAla存在下では修飾されない。

AspTは、Asp : Ala Exchanger (AAEx)ファミリー輸送体の最初の例であり、ゲノム情報から、細菌においては800種以上の相同遺伝子が存在する。それら相同遺伝子の中には、アミノ酸生産菌コリネ菌のコハク酸輸送体SucE1(成果発表論文①)など、産業的にも有用なものも多く含まれる。排出輸送体は、一般に $K_m$ 値が大きく、生化学的な解析が殆ど行われていない。本研究成果は、 $K_m$ 値の小さな取り込み輸送体と $K_m$ 値の大きな排出輸送体のハイブリッド型である交換輸送体の構造機能の理解に寄与する。さらに、AspTと産業上重要な $K_m$ 値の大きな排出輸送体群との比較生化学解析は、排出輸送体の機能の理解と、それに続く産業利用技術基盤を提供するものである。

## 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5件)

① 福井啓太, 七谷 圭, 阿部敬悦, 産業微生物由来のアスパラギン酸: アラニン交換輸送体(AAEx)ファミリーに属する膜輸送体の機能と産業応用, 化学と生物 52:

111-118 (2012) (査読無し)

- ② □ Sasahara A., K. Nanatani, M. Enomoto, S. Kuwahara, and K. Abe, Substrate specificity of the aspartate:alanine antiporter (AspT) of *Tetragenococcus halophilus* in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* 査読有 286:29044-29052 (2011)
- ③ □ Fukui K, C. Koseki, Y. Yamamoto, J. Nakamura, A. Sasahara, R. Yuji, K. Hashiguchi, Y. Usuda, K. Matsui, H. Kojima, and K. Abe, Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J. Biotech.* 査読有 154:25-34 (2011)
- 他 2 件

[学会発表] (計 10 件)

- ① 木村拓哉、笹原綾子、七谷圭、阿部敬悦、乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の aspartate:alanine 交換輸送体 AspT の第3膜貫通領域変異体を用いた基質認識機構の解析, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月21-24日, 国立京都国際会館(京都)
- ② Keietsu Abe and Kei Nanatani, Energy generation coupled with decarboxylation reactions in lactic acid bacteria, IUMS 2011, 2011年9月9日, 札幌コンベンションセンター(札幌)
- ③ 笹原綾子、木村拓哉、七谷圭、阿部敬悦、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来の Aspartate:Alanine 交換輸送体、AspT の基質特異性解, トランスポーター研究会 2010, 2010年7月10-11日, 東京医科歯科大学, 東京
- 他 7 件

[図書] (計 3 件)

- ① Nanatani K., and Abe K., “Energy generation coupled with decarboxylation reactions in lactic acid bacteria.” *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*, Chapter 4 pp67-87, Yokota A. and Sonomoto K. eds., Caister Academic Press (2011)
- ② 七谷圭, 阿部敬悦, その他のエネルギー獲得系 - 有機酸・アミノ酸の脱炭酸, 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス」京都大学学術出版会, pp155-167 (2010)
- ③ 阿部敬悦, 糖の輸送系とカタボライト制御, 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエン

ス」京都大学学術出版会, pp134-145 (2010)

[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 敬悦 (ABE KEIETSU)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 50312624

研究者番号:

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: