

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560943

研究課題名(和文) バクテリア多面体オルガネラ蛋白質の相互作用機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Investigation of the protein-protein interactions in a bacterial polyhedral organelle and their application

研究代表者

飛松 孝正 (Tobimatsu, Takamasa)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：30188768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：相当数の細菌は、アルデヒドのような揮発性の中間体を生じる代謝を、タンパク性の殻からできた多面体構造体(オルガネラ)の中で行っている。本研究では組換え体大腸菌での多面体オルガネラ遺伝子の発現系を開発して、その機能を解析した。さらにいくつかのオルガネラ酵素と代謝の鍵酵素であるジオールデヒドラターゼとが相互作用することを見出した。これらより、オルガネラの形成に酵素間での相互作用の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Considerable number of bacteria have proteinaceous polyhedral organelle in which metabolic reactions are carried to minimize the loss of volatile metabolic intermediates. In this study, we have developed expression system for polyhedral organelle genes, and analyzed their functions. We also found new interactions between some organelle enzymes, including diol dehydratase which was a key enzyme in the organelle metabolic pathway. These results suggest the importance of auto-assembly of the organelle enzymes in the formation process of polyhedral organelle.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生体触媒 細菌 細胞小器官 ナノバイオ バイオリクター

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

原核生物は細胞内に、脂質二重膜で区切られたオルガネラをもたないといわれている。しかし、ウイルスのカプシド様の多面体構造の蛋白性の殻をしたオルガネラをもつものがある。その例がカルボキシゾームであるが、その殻蛋白と相同な遺伝子を多くの細菌が持つことが近年のゲノム解析により示されており、多面体オルガネラは多くの原核生物がもちうる一般的な細胞内オルガネラと考えうることが明らかになってきている。

これらの多面体オルガネラは、代謝酵素を内部に閉じ込めて一連の代謝反応を行っている。大きさは 100nm 程度であり、ナノスケールのバイオリクターである。その必要性は二酸化炭素やアルデヒドなどの揮発性の代謝中間体を内部に閉じ込めることで拡散による逸失を防いで代謝を迅速に進めるためであると考えられている。この多面体オルガネラの応用を目指して我々だけでなく、欧米のグループもこのオルガネラの形成過程の解明に着手している。

我々がかねてより研究していた補酵素 B12 関与酵素のジオールデヒドラターゼ (DD) は、*Klebsiella* が 1,2-プロパンジオールの嫌気生育時に誘導生成される多面体オルガネラ (pdu オルガネラ) の主要な酵素である上に、このオルガネラの代謝系がグリセロールを栄養源とする場合にも用いられて、PET よりもより高機能なポリエステル原料である 1,3-プロパンジオールに変換する。このことから、このオルガネラはバイオリクターへの応用としてだけでなく、近年デュポン社が推し進めているバイオによる 1,3-プロパンジオール生産に置き換わりうる生産法になるものであると注目している。

また、大腸菌で単独に発現させた DD は低溶解性である。トリプシンによる限定分解で DD が可溶性酵素になることより、DD の分子間相互作用により低溶解性となっていると考えられる。我々はその部位を検索し、および サブユニットの N 末領域であることを明らかにしていた。オルガネラへの酵素の集合には、オルガネラ酵素間の相互作用が必要であり、これらの相互作用の解明こそがオルガネラ酵素の集合と組み込みメカニズムの鍵であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではこの pdu オルガネラ内のオルガネラ蛋白質間の相互作用の詳細を明らかにし、オルガネラの形成と蛋白質組み込みの仕組みを明らかにする。それに加えて、それらの相互作用と生理機能との関わりも解明する。さらに、オルガネラへの外来蛋白質の組み込み法の開発やオルガネラ蛋白質の相互

作用を利用する蛋白質の簡便な精製法の開発などの応用も検討する。

3. 研究の方法

(1) pdu オペロンの発現系の開発と大腸菌組換え体の機能解析

pdu オペロン全体の発現系の開発

ジオールデヒドラターゼのクローニングで得られたクローン、pUC(DD11)は DD 遺伝子を発現するクローンであったが、このクローンがもっていたのは約 20-kb の pdu オペロンの上流半分だけで、下流部分をもっていなかった。そこで、下流側の pdu オペロン領域を PCR で順次増幅させて単離し、これらを組み込むことで約 20-kb の pdu オペロン全体を含むプラスミド、pUC(pdu_operon)を作成した。さらに、オペロン全体を、T7 プロモーターをもつ pET21b ベクターに組み込み pET21b(pdu_operon)を作成した。これらが大腸菌 BL21 (DE3) や大腸菌 JM109(DE3) に導入して大量発現させた。

各 pdu オペロン遺伝子の発現系の開発

pdu オペロン内には連結可能な XbaI と SpeI の切断サイトがない。そこで、pET21b に SpeI サイトを導入した pET21bSp を作成し、その NdeI-SpeI サイトに、PCR にて増幅させた各 pdu 遺伝子を導入した。クローン化した遺伝子をふくむ XbaI-SpeI 断片を他の遺伝子を含む pET21bSp 内の XbaI または SpeI サイトに導入することで遺伝子を同時に発現できるように連結した。また、pET21bSp 内の各遺伝子の終止コドン除去することで蛋白の C-末端に His タグがつく遺伝子の発現系を作成した。作成した発現プラスミドは大腸菌 BL21 (DE3) や大腸菌 JM109(DE3) に導入して大量発現させた。

(2) 補酵素 B12 の in vitro 再生系

不活性化 DD のモデル酵素として DD・CN-B12 複合体を用い、FNMH₂、ATP、PduGH 再活性化因子、PduO アデノシル転移酵素などの共存下で回復した DD の酵素活性を測定することで補酵素 B12 の再生能を評価した。PduO のコントロール用のアデノシル転移酵素として EutT と CobA を用いた。

(3) オルガネラ蛋白質間の相互作用の解析

オルガネラ蛋白質間の相互作用は His タグと Ni カラムの相互作用を用いたプルダウンアッセイや電気泳動、HPLC によるゲル濾過法により解析した。

(4) DD サブユニット N 末領域の機能解析

サブユニットの N 末領域遺伝子を His タグや各種酵素遺伝子と融合させて発現させそれらの相互作用の有無をプルダウンアッセイや電気泳動により測定した。

4. 研究成果

(1) *pdu* オペロンの大腸菌での発現と機能解析

約 20-kb の *pdu* オペロン全体を含むプラスミド、*pUC(pdu_operon)* を大腸菌 JM109 に導入して、オペロンの発現をみたところ、DD の酵素活性が見られなかった。これより、*pUC* は *pdu* オペロンの発現系に向かないことが示された。

そこで、T7 プロモーターをもつ *pET21b* ベクターにオペロン全体を組み込んだ。得られたプラスミド *pET21b(pdu_operon)* を大腸菌 BL21 (DE3) に組み込んで、発現を誘導したところ、親菌のクレブシラの約 10 倍もの DD 活性やオペロンの下流に存在している *PduP* 活性がみられた。これらの酵素活性や殻蛋白質が膜画分に存在することより、大腸菌が *pdu* オルガネラ遺伝子を効率よく発現していることが明らかになった。

そこで、このオルガネラの応用の一例に上げていた、工業的に有用な 1,3-プロパンジオールの生成の有無を調べた。培地にビタミン B12 を添加してグリセロール培地で大腸菌を培養したが、培地中に 1,3-プロパンジオールの生成は認められなかった。大腸菌 BL21 は B12 の取り込み効率が低いという報告があったので、大腸菌 JM109(DE3) を宿主に用いたが、少量の 1,3-プロパンジオールが生成しただけであった。これらより、大腸菌を宿主に用いて B12 酵素を利用する場合には、酵素類の発現量よりも B12 の取り込みの改善が重要であると示された。

(2) 補酵素 B12 リサイクル系酵素群の協同性

pdu オルガネラの主要酵素である DD はラジカル反応を触媒するので、反応触媒中に補酵素 B12 が高頻度に不活性化される。しかし、親菌においても、含有する補酵素 B12 は微量であるので、菌が代謝を維持して生育するには不活性化になった補酵素を再生することが必要である。親菌の無細胞抽出液に還元剤 FMNH_2 と ATP、 MgCl_2 とを共存させると DD の触媒能が回復することより、このような再生系の存在が示されていた。補酵素 B12 の再生に必要な蛋白質の因子は *pdu* オペロン内にあると考えられるので、再生を担うと考えられる酵素を精製し、再構成を試みた。不活性化 DD のモデル酵素として DD・CN-B12 複合体を用い、不活性化された補酵素 B12 を DD から解離させることをすでに報告している *PduGH* 再活性化因子と *PduO* アデノシル転移酵素を加え、 FMNH_2 と ATP、 MgCl_2 を共存させると、DD に触媒能が生じた。グリセロール基質で生じた不活性化補酵素 B12・DD 複合体でも DD の触媒機能の回復がみられた。これらの補酵素 B12 の再生には *PduGH* 再活性化因子と *PduO* アデノシル転移酵素に加え、 FMNH_2 と ATP、 MgCl_2 のすべての共存が必須であった。コバラ

ミンへのアデノシル転移酵素活性を有する *EutT* や *CobA* を *PduO* の代わりに用いても補酵素 B12 の再生は見られた。しかし、同じ量のアデノシル転移酵素活性を使用すると *EutT* や *CobA* の場合には *PduO* を用いた場合に比べて補酵素 B12 の相対的再生効率が低いことが示された。3 種類のアデノシル転移酵素が DD から遊離したコバラミンと単独に結合して反応して補酵素 B12 を再生 (活性化) するのであればこのような差は生じないはずである。精製した *PduO* と DD や *PduGH* との複合体形成を HPLC など直接確認することはできなかったが、これら補酵素 B12 の再生を担う他の酵素群はお互いに相互作用してシステムとして働いていると示唆された。さらに、*PduO* タイプのアデノシル転移酵素は動物にも存在するが、このシステムとしての働きに必要な領域がバクテリア *PduO* のみに特徴的にみられる C 末ドメインではなく、ヒトからバクテリアに存在する N 末端触媒ドメインに依存することも示された。この研究成果は、オルガネラ酵素間の相互作用の生理的な重要性を示したものであるとともに、補酵素 B12 の再生系の工業的な応用に道を拓くものである。

(3) DD と他のオルガネラ酵素の相互作用

DD の サブユニットの N 末端ペプチドは *pdu* オルガネラへの組み込みシグナルとして働くことが報告されている。DD はオルガネラにもっとも豊富に存在する酵素であり、自己集合性も備えた酵素である。このような酵素に他のオルガネラ酵素が相互作用することで、オルガネラへの組み込みシグナルをもたない酵素も組み込まれているものと考えている。そこで、その可能性を調べるために、DD と他のオルガネラ代謝酵素との相互作用の解析を サブユニットの C 末端に His タグを付加した DD をもちいてプルダウンアッセイにより行った。

PduL ホスホトランスアシラーゼや *PduQ* プロパノールデヒドロゲナーゼと、DD との間には明らかな相互作用が見られた。また、*PduW* プロピオン酸キナーゼとの間にも相互作用の可能性が示された。*PduP* CoA 依存性プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼと DD とが親菌から複合体として一緒に精製されることや、*PduGH* ジオールデヒドラターゼ再活性化因子や *PduO* アデノシル転移酵素が DD と相互作用しながらシステムとして補酵素の再生を行っていることを考慮すると、オルガネラへの酵素類の詰め込みには、DD と酵素類との相互作用が中心的役割を果たしていると考えられる。現在明らかにしたのは酵素レベルの相互作用であるが、この酵素間の相互作用に關与する領域の同定をさらに進めなければ、オルガネラをバイオリクターとして

用いる際の酵素群の組み込み技術の開発に
応用できるものと期待される。

(4) DD の および サブユニットの N 末端
ペプチドの相互作用の様式

DD の等機能酵素である、可溶性酵素のグリセ
ロールデヒドラターゼに DD の および サ
ブユニットの N 末端領域を付加すると DD の低
溶解性という性質を付加できることから、こ
れらの領域が相互作用して低溶解性化して
いると考えられる。そこで、これらの領域を
ホモ二量体酵素のグルタチオン-S-トランス
フェラーゼ(GST)やイソシトレート脱水素酵
素(ICDH)、ホモ四量体酵素のラクトアルデ
ヒド脱水素酵素(AldA)やホスホフルクトキ
ナーゼ(PfkA)の N 末端に付加し、それらの相
互作用をそれらの可溶性酵素の低溶解性化
を指標にして調べた。その結果、ホモ二量体
酵素では溶解性に変化が認められなかった
が、ホモ四量体酵素は サブユニットの N 末
領域を付加するだけで低溶解性化していた。

サブユニットの N 末端領域でも低溶解性化の
傾向がみられた。この結果は、 や サブユ
ニットの N 末端ペプチドは同種ペプチドと
相互作用でき、巨大分子集合体になることを
示唆している。そこで可溶性であった二量体
酵素の GST 誘導体を精製し、同種 N 末端ペ
プチド間の相互作用による分子集合の有無を
分子量の変化を指標にして評価することに
した。FPLC のゲル濾過カラムを用いて分子量
を測定すると、GST が二量体の 55K であつた
のに対し、 サブユニット N 末端領域を付加す
ると 10~12 量体に、 サブユニット N 末
領域を付加すると 2~4 量体にピークが移っ
ていた。これより、同一サブユニットの N 末
端ペプチド同士が相互作用することと、 サ
ブユニットの N 末端間よりも サブユニット
の N 末端間の方がより強く相互作用するこ
とが示された。

次に、 と サブユニットの N 末端間に相
互作用が見られるのかを確認する目的でこ
れらの N 末端領域の C 末端側に His タグを付加
し、これらと二量体酵素との相互作用をブル
ダウンアッセイにより調べた。DD サブユ
ニットの N 末端領域間どうしと同等の相互作用が
と サブユニットの N 末端領域間にみられた。
以上より、DD の と サブユニットの N 末
領域は同種・異種のいずれの N 末端領域とも相互
作用することが示された。

(5) 蛋白質の簡便な精製法の開発

ホモ四量体酵素 AldA や PfkA の N 末に と
サブユニットの N 末端領域を付加すると低溶
解性化でき、DD のように不溶性画分を洗浄後
に弱い界面活性剤を含む溶液で抽出操作す
ることで簡便に精製できるのは前述の通り
である。

そこで次に、二量体酵素への適用を検討し
たが、二量体酵素サブユニットの N 末端に DD

や サブユニットの N 末端領域を付加するだ
けでは低溶解性化できなかったのは前述の
通りである。そこで、N 末端に加えて C 末
端にも N 末端領域を付加してみた。すると、二
量体酵素に溶解性の低下がみられた。それらの
改変酵素の溶解性は、タグとして用いる領域
の範囲や、細胞破碎や洗浄時の条件により変
動したが、これらを調節することで、用いた
二量体酵素で実用化可能な程度の酵素の回
収率を実現できている。通常の工業的精製で
は高価なカラムを必要としたり、時間もかか
ったりすることから、それに見合った高い加
価値をもつ酵素しか工業的には精製できな
いのが現状である。しかし、この低溶解性化
の手法は汎用機器の遠心機さえあれば使用
できる簡便な手法であり、回収率の更なる改
善をすれば、コストと手間のかからない簡便
かつ安価な精製法としての高い将来性をも
つ手法だと考えている。

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4件)

Mori T, Mori K, Tobimatsu T, Sera T.,
Sandwiched zinc-finger nucleases
demonstrating higher homologous
recombination rates than conventional
zinc-finger nucleases in mammalian cells.,
Bioorg Med Chem Lett., 24 (3), 査読有, 2014,
813-816, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.096.

Mori K, Oiwa T, Kawaguchi S, Kondo K,
Takahashi Y, Toraya T., Catalytic roles of
substrate-binding residues in coenzyme
B12-dependent ethanolamine ammonia-lyase.
Biochemistry, 53 (16), 査読有, 2014,
2661-2671. doi: 10.1021/bi500223k.

Mori K, Obayashi K, Hosokawa Y, Yamamoto
A, Yano M, Yoshinaga T, Toraya T.,
Essential roles of nucleotide-switch and
metal-coordinating residues for chaperone
function of diol dehydratase-reactivase.
Biochemistry. 52 (48), 査読有, 2013,
8677-8686. doi: 10.1021/bi401290j.

Yamanishi M, Kinoshita K, Fukuoka M,
Saito T, Tanokuchi A, Ikeda Y, Obayashi H,

Mori K, Shibata N, Tobimatsu T, Toraya T.,
Redesign of coenzyme B(12) dependent diol
dehydratase to be resistant to the
mechanism-based inactivation by glycerol
and act on longer chain 1,2-diols. FEBS
Journal, 279 (5), 査読有、2012, 793-804.
doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08470.x.

〔学会発表〕(計 9件)

山崎藍, 中村雄大, 齋藤翔太, 田野口亜耶,
小倉謙一, 飛松孝正, 虎谷哲夫、3 種類の
Klebsiella oxytoca コバラミン・アデノシル
トランスフェラーゼに関する酵素化学的
研究、日本ビタミン学会第 65 回大会、
2013.5.18、東京都

森光二, 大岩敏宏, 高橋佑典, 近藤恭介,
世良貴史, 虎谷哲夫、ビタミン B12 補酵素関
与エタノールアミンアンモニアリアーゼの
基質結合アミノ酸残基の機能解析、日本ビタ
ミン学会第 65 回大会、2013.5.18、東京都

飛松孝正, 山崎藍, 中村雄大, 齋藤翔太,
田野口亜耶, 小倉謙一, 虎谷哲夫、Klebsiella
の 4 つのコバラミン・アデノシルトランスフ
ェラーゼに関する酵素化学的研究、第 432 回
ビタミン B 研究協議会、2013.5.16、東京都

虎谷哲夫, 田野口亜耶, 山崎藍, 小倉謙一,
中村雄大, 飛松孝正、ジオールデヒドラター
ゼの活性維持システムによる補欠分子族型
補酵素のリサイクリング、第 431 回ビタミン
B 研究協議会、2013.2.2、大阪市

虎谷哲夫, 山西守, 木下宏一郎, 福岡正喜,
齋藤拓也, 田野口亜耶, 池田祐輝, 大林弘和,
森光二, 柴田直樹, 飛松孝正、B12 補酵素関
与ジオールデヒドラターゼのグリセロール
による不活性化の機構と不活性化抵抗性酵
素の再設計、ビタミン B 研究委員会第 427
回研究協議会、2012.2.4、京都市

大岩敏宏, 高橋佑典, 近藤恭介, 森光二, 虎
谷哲夫、B12 補酵素関与エタノールアミンア
ンモニアリアーゼの活性部位アミノ酸残基
の機能解析、第 84 回日本生化学会大会、
2011.9.22、京都市

田野口亜耶, 山崎藍, 小倉謙一, 中村雄大,
飛松孝正, 虎谷哲夫、ジオールデヒドラター
ゼ活性維持システムの一員としての PduO
蛋白質の機能解析、第 84 回日本生化学会大
会、2011.9.22、京都市

田尻麻衣, 塚田浩之, 田中佑樹, 灰垣佑輝,
安原麻衣, 森光二, 虎谷哲夫、大腸菌 YgfD
蛋白質の B12 補酵素関与メチルマロニル
CoA ムターゼの再活性化因子としての機能
解析、日本ビタミン学会第 63 回大会、
2011.6.5、広島市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飛松 孝正 (TOBIMATSU TAKAMASA)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：30188768

(2)研究分担者

森 光一 (MORI KO-ICHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：50379715