

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780096

研究課題名(和文)新規ハロアルキルリン酸加水分解酵素のペリプラズム移行経路とN末端修飾意義の解明

研究課題名(英文) Study on the N-terminal modification and secretory pathway of novel haloalkylphosphorus hydrolase.

研究代表者

阿部 勝正 (ABE, Katsumasa)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40509551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難分解性含塩素化合物リン酸トリス(1,3-ジクロロプロピル)(TDCPP)分解菌 *Sphingomonas* sp. TDK1が有するハロアルキルリン酸加水分解酵素は、他の有機リン加水分解酵素とは明らかに異なる特徴をいくつも有している。本研究では本酵素がこれまでの有機リン加水分解酵素とは異なる経路で菌体外に分泌されている可能性を示し、本分泌に関わる重要なアミノ酸残基も同定した。また、TDK1株のドラフトゲノム解析を通して推定ピログルタミン酸酸化酵素遺伝子がTDK1株に存在することを明らかにし、本酵素のN末端は菌体内で酵素的にピログルタミン酸化されていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Haloalkylphosphorus hydrolase (HAD) from tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP)-degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. strain TDK1, exhibits unique properties and, therefore, is different from other bacterial organophosphorus hydrolase. In this study, I investigated the localization and the mechanism of N-terminal modification of HAD. The genes involved in protein secretion, *tatABC*, *secDF* and *secYEG*, were identified in the draft genome of TDK1. Furthermore, the glutaminyl cyclase gene was also found, indicating that the N-terminal glutaminyl residue of HAD is enzymatically modified. Localization analysis of HAD in *E. coli* suggested that the HAD exports via Sec pathway but not Tat pathway. Deletion analysis of signal peptide of HAD showed that this sequence is crucial for the activity of HAD. Finally, the amino acid residues in the signal peptide essential for the activity HAD were identified.

研究分野：応用微生物学

キーワード：有機リン化合物 加水分解酵素 シグナルペプチド ピログルタミン酸 難分解性環境汚染物質

1. 研究開始当初の背景

リン酸トリス (1,3-ジクロロプロピル) (TDCPP) などのハロアルキル系有機リン酸トリエステルは可塑剤や難燃材として世界各地で大量に用いられているが、これらは蓄積性もあり、種々の毒性を有する。近年、これら化合物の環境への流入が問題視され、その微生物分解法の開発が望まれていたが、ハロアルキル系有機リン酸トリエステルを分解可能な酵素に関する知見はこれまで全く報告されていなかった。研究代表者はこれまで、種々のハロアルキル系有機リン酸トリエステル生物分解システム構築のための基礎を築く事を目的として、当研究室で単離した TDCPP を分解可能な菌 *Sphingomonas* sp. TDK1 から新規ハロアルキルリン酸加水分解酵素 (haloalkylphosphate hydrolase; HAD) の精製・特徴解析、さらに、その遺伝子 (*had* gene) の単離を行ない、新奇長鎖シグナルペプチドの存在や、N 末端アミノ酸残基修飾など、本酵素が他の有機リン加水分解酵素には見られない種々の特徴を有している非常にユニークな酵素であることを明らかにしてきた。本酵素の極めて特異的な特徴の生理的意義・機能の解明は今後の環境汚染物質分解酵素研究、さらには、バクテリア酵素の N 末端修飾に関する新規知見を与えると考えられる。上述の特徴を同時に有する酵素は HAD 以外には存在せず、唯一の酵素である本酵素を用いた解析が望まれている。

2. 研究の目的

Sphingomonas sp TDK1 から単離に成功した難分解性含塩素化合物・リン酸トリス (1,3-ジクロロプロピル) (TDCPP) を分解するハロアルキルリン酸加水分解酵素は、これまでに分解報告のない有機リン化合物を基質とするだけでなく、そのペリプラズムへの輸送経路、N 末端アミノ酸修飾など、他のバクテリア酵素とは異なる、非常に特異的な性質をいくつも有していることが明らかになった。本研究では、これらの中でも特に新規性の高い、ペリプラズム輸送経路とタンパク質 N 末端修飾の酵素学的・生理的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組換え HAD 発現大腸菌の構築

had 遺伝子を TDK1 株ゲノム DNA を鋳型とした PCR で増幅し、制限酵素処理後に pET25b および pBAD24 ベクターにそれぞれ挿入した。得られた発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、組換え HAD 発現大腸菌とした。

(2) シグナル配列欠損型 HAD 発現系の構築

N 末端欠失型 *had* 遺伝子発現ベクターは上記 (1) で構築した発現ベクターを鋳型として、KOD-Plus-Mutagenesis Kit の手順に従って構築した。

(3) 組換え大腸菌を用いた HAD の局在解析
組換え大腸菌の分画はコールドオスモティック法を用いて行い、分画精度は、各画分にのみ存在するマーカー酵素の活性測定を行うことで確認した。ペリプラズム画分におけるマーカー酵素として酸性ホスファターゼ (ACP)、サイトゾル画分におけるマーカー酵素としてグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) を選択し、過去に検討された反応条件に基づいて活性を測定した。TDCPP の局在については、TDCPP 分解活性、及び、分画操作中の酵素活性の失活などの影響等を考慮しウェスタンブロットでの解析も同時に行った。

(4) N 末端 HN タグ融合 HAD 発現大腸菌の構築と精製

HN タグをコードする遺伝子を含むプライマーを用いた PCR で、HN タグ融合 HAD をコードする遺伝子を得た。得られた遺伝子を pET25b に挿入した後、大腸菌 BL21(DE3) に導入した。HN タグ融合 HAD の精製は TALON Metal Affinity Resin を用い、吸着タンパク質の溶出はイミダゾールを含む緩衝液で行った。精製度の確認は SDS-PAGE 解析で行った。

4. 研究成果

(1) TDK1 株ドゲノムのドラフト解析

TDK1 株において、ペリプラズム輸送および N 末端修飾に関わる遺伝子を同定するため、イルミナ社 MiSeq を用いた TDK1 株ゲノムのドラフト解析を行った。

ドラフト解析結果及び近縁種である *Sphingomonas wittichii* で明らかにされている配列を基に、TDK1 株中で分泌に関わると考えられる *tatABC*, *secDF*, *secYEG* 遺伝子の全配列を同定した。また、推定ピログルタミン酸化酵素遺伝子が TDK1 株に存在することも明らかとなり、本酵素の N 末端は菌体内で酵素的にピログルタミン酸化されていることが強く示唆された。

(2) HN タグ融合 HAD 発現系の構築と精製

N 末端修飾が酵素活性に与える影響を解析するため、簡便に精製可能であり、さらに、N 末端のピログルタミン酸化が起こらない、大腸菌を用いた HN タグ融合酵素発現系を構築することとした。

HN タグ融合 HAD 発現大腸菌の破碎上清は TDCPP 分解活性を示し、その活性は野生型組換え HAD 発現系および TDK1 株の場合と同程度であった。また、SDS-PAGE から、およそ 64 kDa, 58 kDa の位置にコントロール (pET-25b(+)) では見られないバンドが確認された。本分子質量は HN タグ融合 HAD および成熟 HN タグ融合 HAD の推定分子質量と一致することから、本発現系において HAD-HN が活性を有する酵素として発現した事を確認した。

固定化金属アフィニティ樹脂である TALON Metal Affinity Resin を用いた、HN タグ融合 HAD 精製の検討では、HAD-HN が本カラムのみでほぼ均一に精製可能であることを明らかにした (図 1)。

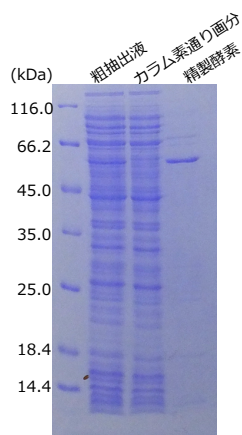


図 1 HN タグ融合 HAD の精製

(3) IPTG 誘導型 pET 発現系を用いた HAD の局在解析

pET システムによる当該酵素発現大腸菌での細胞分画法を確立し、その局在について酵素活性測定とウェスタンブロットで解析を行った。その結果、本酵素は細胞質とペリプラズムの両画分に存在することが明らかになった (図 2A)。本結果について、大腸菌での過剰発現がその局在に大きな影響を与えた可能性も考えられるため、発現量の調節可能な発現系を構築し、再度局在に関する検討を行った。

(4) アラビノース誘導型 pBad 発現系を用いた HAD の局在解析

上述の解析では pET 発現系の特徴である IPTG 誘導による酵素の大量発現が影響を及ぼした可能性が考えられ、より野生型酵素の発現量に近く、発現調節の容易な大腸菌発現系の構築が求められた。本研究では上記条件を満たす発現ベクターとして pBAD を選択し再度局在解析を行った。

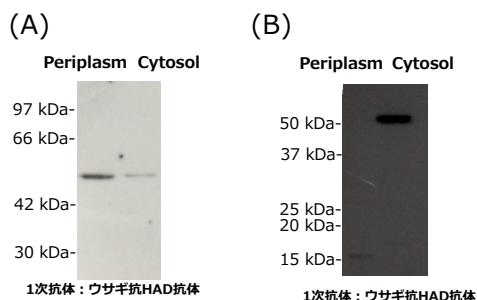


図 2 HAD の局在解析 (ウェスタンブロット解析)
(A) pET 発現系 (B) pBAD 発現系

解析の結果、TDCPP 分解活性は大部分がサイトゾルで確認され、またウェスタンブロット解析においても同様に、サイトゾル画分でのみ約 56 kDa の成熟体酵素と思われるバンドが確認された (図 2B)。以上の結果より、本酵素の持つシグナル様配列は本発現系においては分泌シグナルとして機能しない可能性が示された。また検出されたバンドは 56 kDa の成熟体酵素のみであり、本酵素はペリプラズムに存在するシグナルペプチダーゼではなく、サイトゾル画分における内在性のプロテアーゼによりプロセッシングを受ける可能性が考えられた。

(5) シグナル配列欠損が酵素活性に及ぼす影響

推定されたシグナル配列の存在が HAD の活性発現にどのような影響を与えるのか確認するために、シグナル配列を完全に除いた N 末端欠失型 HAD を大腸菌において発現させ、既に構築されている組換え HAD の活性と比較した。

各大腸菌組換え体の無細胞抽出液を用いて TDCPP 分解活性測定を行った結果、シグナル配列を欠損させた HAD を発現させた場合は活性が見られなくなった (図 3)。細胞内膜を透過してからフォールディングされる Sec 経路を通るタンパク質は還元的環境であるサイトゾル内においてフォールディングすることができないと考えられていることから、本酵素のシグナル配列は Sec 経路による輸送を指示することが強く示された。

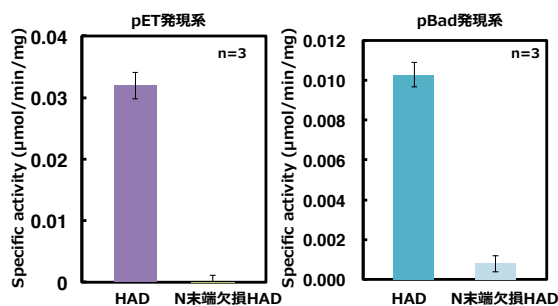


図 3 シグナル配列欠損が酵素活性に及ぼす影響

(6) シグナル配列中における重要なアミノ酸残基の同定

本配列には一般的なシグナル配列間において分泌で重要な役割を果たすとされているアミノ酸残基が複数保存されている。これらアミノ酸残基が本酵素中でどのような機能を有するかは不明であることから、このなかでも塩基性アミノ酸残基 (二つのアルギニン残基) に着目し、変異導入解析を行うこととした。

シグナル配列へ変異を導入した HAD1 RR →AA 変異体 では大きな活性減少が確認された。またウェスタンブロット解析においても同様の傾向が示された事から、シグナル様領域部分に保存された塩基性アミノ酸残基は活性発現に重要な役割を果たしていると考えられた。また成熟体酵素での発現が確認されていることから、シグナル配列部分の切断に関する影響はないものと考えられた。

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 3 件)

- ① Abe, K., Yoshida, Y., Suzuki, Y., Mori, J., Doi, Y., Takahashi, S. and Kera, Y. Haloalkylphosphorus hydrolases purified from *Sphingomonas* sp. strain TDK1 and *Sphingobium* sp. strain TCM1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 5866-5873, 査読有
DOI: 10.1128/AEM.01845-14.
- ② Takahashi, S., Miura, K., Abe, K. and Kera, Y. Complete detoxification of tris(2-chloroethyl) phosphate by two bacterial strains: *Sphingobium* sp. strain TCM1 and *Xanthobacter autotrophicus* strain GJ10. *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 306-311, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.04.010
- ③ Kera, Y., Takahashi, S. and Abe, K. Biodegradation of persistent chlorinated organophosphorus flame retardants by microorganisms newly isolated from soil. *Transactions on GIGAKU*, pp. 01011/1-4, 2012, 査読有
<http://lib.nagaokaut.ac.jp/gigaku-press/transactions/27/>

[学会発表] (計 20 件)

- ① Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera: Characterization of haloalkylphosphorus hydrolase from *Sphingomonas* sp. strain TDK1. HUST - NUT Joint Symposium 2014, 2014年11月27日, Hanoi (Vietnam)
- ② 阿部勝正、小林豊和、櫻庭裕樹、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の分泌に関する検討. 2014年度日本生物工学会大会、2014年9月9日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

- ③ Yuki Sakuraba, Katsumasa Abe, Shoji Takahashi, Yoshio Kera : Cloning of the gene for tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate-degrading enzyme from *Sphingomonas* sp. TDK1. The 3rd international GIGAKU conference in Nagaoka, 2014年6月21日, 長岡技術科学大学 (新潟県長岡市)
- ④ 恩田穰、三浦兼春、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫: 難分解性環境汚染物質リン酸トリス (2-クロロエチル) の微生物分解技術の開発. 環境バイオテクノロジー学会 2013年度大会、2013年09月05日、北九州国際会議場 (福岡県北九州市)
- ⑤ Yutaka Onda, Kaneharu Miura, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera : MICROBIAL DETOXIFICATION OF A PERSISTENT ENVIRONMENTAL CONTAMINANT, TRIS(2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE. The 2nd international GIGAKU conference in Nagaoka, 2013年6月22日, 長岡技術科学大学 (新潟県長岡市)
- ⑥ 阿部勝正、川上和延、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸加水分解酵素の生理機能解析. 第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑦ 小林豊和、川上和延、阿部勝正、高橋祥司、解良芳夫: *Sphingomonas* sp. TDK1 株ハロアルキルリン酸トリエステル加水分解酵素の機能解析. 第64回日本生物工学会大会、2012年10月24日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

[図書] (計 1 件)

- ① Takahashi, S., Abe, K. and Kera, Y. (2013) Microbial degradation of persistent organophosphorus flame retardants. In: Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications (Ed., Petre, M.), pp. 91-122, InTech, Croatia.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://envbiochem.web.fc2.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 勝正 (ABE KATSUMASA)
長岡技術科学大学・工学部・助教
研究者番号：40509551

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し