

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660062

研究課題名(和文)体腔形成細菌の新規な金属輸送機構の解明とその放射性物質・レアメタル回収への応用

研究課題名(英文)A novel metal-import system in the pit-forming bacterium and its application for recovery of radioactive compounds and rare metals

研究代表者

橋本 渉 (Hashimoto, Wataru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30273519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：金属キレート能を示す多糖アルギン酸を細胞内に取り込むSphingomonas属細菌A1株について、その細胞表層とアルギン酸結合タンパク質Alg7の構造と機能を解析した。アルギン酸カルシウムゲルに接着した細胞は、表層構造が窪んだ体腔を形成する。その窪みの深さは100 nm程度であり、体腔形成部位はその周囲と比較すると高電位である。Alg7は、レアメタル(Sm³⁺とTl³⁺)と結合し、Lys68とLys69による正電荷クラスターでアルギン酸と結合することが示唆される。以上の結果から、体腔の高電位が負電荷のアルギン酸の濃縮に機能し、Alg7を用いてレアメタルを回収できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A gram-negative bacterium, Sphingomonas sp. A1, incorporates metal-chelating alginates. In this study, structure and function of the bacterial cell surface and alginate-binding protein Alg7 were analyzed by microscopy, differential scanning fluorimetry, or X-ray crystallography. The bacterial cells attached to alginate-calcium gels formed a pit on the cell surface. The pit showed about 100 nm in depth and high electrical potential. Alg7 exhibited a capability to bind rare metals such as Sm³⁺ and Tl³⁺, and to associate with alginate at the positively charged cluster formed by Lys68 and Lys69. These results suggest that the high electrical potential in the pit contributes to concentration of negatively charged alginate and Alg7 is applicable for recovery of rare metals.

研究分野：応用微生物学

キーワード：細菌 アルギン酸 レアメタル 輸送体 電子顕微鏡 原子間力顕微鏡 X線結晶構造解析 示差走査型蛍光定量法

1. 研究開始当初の背景

鉄は、生体内において酸化還元に関わる酵素や、酸素分子の運搬に関わるタンパク質などの補因子として必須の金属である。細菌も生育に鉄を必要とするため、巧妙な鉄輸送系をもっている。特に、シデロフォア依存のABC トランスポーターによる鉄取り込み系の解析が進んでいる。一方、近年 ABC トランスポーターを介さない鉄輸送系 (EfeU, EfeO, EfeB) の存在が遺伝学的解析により大腸菌で見出され、その分子機構が *in silico* 解析から提唱されている。細胞外からペリプラズムに流入した Fe^{2+} が基質結合タンパク質 EfeO と結合し、EfeO とペルオキシダーゼ EfeB との協調作用により Fe^{2+} が Fe^{3+} に酸化され、 Fe^{3+} が膜輸送体 EfeU により細胞質に輸送される。EfeU, EfeO, EfeB の各遺伝子は、大腸菌ゲノム上でオペロンを形成し、EfeO に三つの金属結合モチーフ (Site I~III) が存在する。しかし、これら一連のタンパク質の構造機能相関や分子間相互作用に関する研究は遅れている。

これまでに、本研究者は、アルギン酸を単一炭素源として生育できるグラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株 (以下、A1 株) を対象に、その高分子多糖アルギン酸の取り込み系の実体を明らかにしてきた。細胞外のアルギン酸は細胞表層に形成される体腔 (孔) に濃縮された後、基質結合タンパク質 (AlgQ1 と AlgQ2) と ABC トランスポーター (AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS) の作用により直接細胞質に取り込まれる。取り込まれたアルギン酸は、細胞質で単糖にまで分解される。体腔は、微生物学史上最初の高分子物質取り込み装置である。また、アルギン酸結合能を示す細胞表層タンパク質 Algp7 を同定し、体腔におけるアルギン酸濃縮に機能することを示した。一方、Algp7 は鉄輸送に関わる基質結合タンパク質 EfeO と高い相同性を示し、その遺伝子上流には EfeU, EfeO, EfeB に各々相同性を示すタンパク質 SPH729, SPH728, SPH727 が A1 株ゲノムにコードされている。従って、Algp7 は金属 (鉄) の輸送にも関与することが考えられる。

2. 研究の目的

本研究者は、A1 株由来高分子多糖アルギン酸取り込み系の全高次空間構造と機能発現機構の解明を目指している (図 1)。アルギン酸は各種金属をキレートするため、Algp7 がアルギン酸と金属の両方の取り込みに機能することが示唆される。最近、A1 株が金属をキレートしたアルギン酸ゲルに接着し、そのゲルを分解する予備的知見を得た。また、Algp7 の立体構造決定により、金属結合部位 (Site III) における水素結合ネットワークを明らかにした。本研究では、アルギン酸ゲルを濃縮する体腔の形成機構、並びに金属輸送 Efe 系タンパク質の機能 (金属結合と輸送) 発現機構を、各種顕微鏡解析、X 線結

晶構造解析、及び部位特異的変異解析により明らかにすることを目的とする。

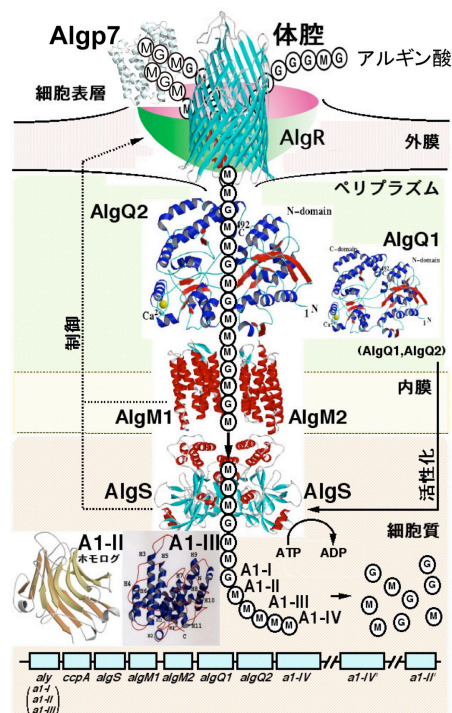


図 1. A1 株のアルギン酸の取り込み機構

3. 研究の方法

(1) 体腔形成 A1 株細胞の顕微鏡解析

A1 株は細胞表層に体腔を形成させる際、膜構造を細胞質側へ陥入させる。体腔形成部位には金属をキレートしたアルギン酸ゲル (白粒) が見られる。そこで、A1 株の細胞表層構造を走査型電子顕微鏡により解析した。また、原子間力顕微鏡解析により A1 株の生細胞に対して、体腔形成を確認し、体腔のサイズと細胞表面電荷を測定した。

(2) Algp7 の金属結合解析

Algp7 の金属結合能を、原子吸光分析により調べた。また、Differential Scanning Fluorimetry (DSF 法) による金属結合性も評価した。蛍光色素 (SYPRO Orange) 存在下で、Algp7 と各種金属とを混合し、金属結合による Algp7 の熱変性特性を解析した。

(3) 金属及びアルギン酸と結合する Algp7 の構造解析

Site III (His115xxGlu118) の金属結合モチーフをもつ Algp7 の金属結合に関わる構造要因を明らかにするため、Algp7 の結晶を調製した。得られた結晶から X 線回折データを収集し、高分解能でのデータ収集は、SPRING-8 の放射光実験施設にて行った。すでに、金属が結合していない結晶構造を決定している。種々の金属を用いて、金属が結合した Algp7 の結晶構造を、分子置換法により決定した。

Algp7 はアルギン酸結合性を示すため、そのアルギン酸結合部位を、部位特異的変異体を用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1) A1 株の体腔形成と特性

大腸菌と A1 株の細胞を用いて、カルシウムでゲル化したアルギン酸に対する作用を調べた。その結果、A1 株の細胞は、生育に伴って、アルギン酸カルシウムゲル（直径約 3 mm）を分解した（図 2 下）。一方、大腸菌ではアルギン酸カルシウムゲルは分解されずに残存した（図 2 上、矢印）。

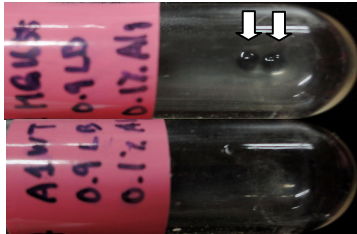


図 2. アルギン酸ゲルの分解(上:大腸菌、下: A1 株、矢印:アルギン酸ゲル)

走査型電子顕微鏡解析により、アルギン酸カルシウムゲルに接着した A1 株細胞に、表層構造が窪んだ体腔の形成が認められた（図 3 左）。さらに、原子間力顕微鏡で解析したところ、生細胞においても体腔が形成されることを確認し、その窪みの深さが 76~147 nm 程度であることが分かった（図 3 中）。また、体腔形成部位は、その周囲と比較すると高電位があることから（図 3 右）、この高電位が負電荷を帯びたアルギン酸の濃縮に寄与していると考えられる。

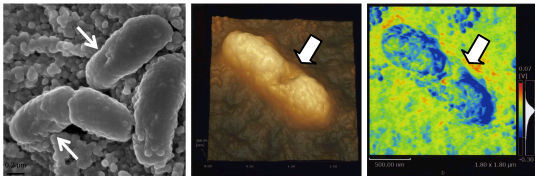


図 3. A1 株の体腔形成(左:走査型電子顕微鏡像、中:原子間力顕微鏡像、右:電位像、各矢印:体腔)

(2) Algp7 の金属（レアメタル）結合能

Algp7 の金属結合性について、原子吸光スペクトル法で解析した。Algp7 と Fe^{3+} または Cu^{2+} とを混合し、透析により金属イオンを除去した後、Algp7 と結合する金属イオンを定量した。その結果、透析後の Algp7 の画分に、 Fe^{3+} または Cu^{2+} が残存することを確認することができた。また、Algp7 の金属結合によるタンパク質の熱変性挙動を調べた。DSF 法は、リガンド存在下或いは非存在下で、タンパク質と蛍光色素 SYPRO Orange とを混合し、加熱することによりその熱変性の変化（融解温度 T_m ）を評価するものである。一

般に、リガンドと結合したタンパク質は、非結合タンパク質と比較すると、構造安定化により高い融解温度を示す。すでに、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} の存在下で、Algp7 の融解温度が上昇することを確認している。そこで、各種レアメタル（ Pd^{2+} 、 Sm^{3+} 、 Pt^{2+} 、 Tl^{3+} など）を 0.1 mM 存在下で、Algp7 の熱変性を調べた。その結果、 Sm^{3+} と Tl^{3+} の存在下で、Algp7 の融解温度が上昇した。レアメタル非存在下では、 T_m 値は 54 度であったが、 Sm^{3+} 存在下では 67 度、 Tl^{3+} 存在下では、63 度と有意に T_m 値が上昇した。さらに、 Sm^{3+} の濃度を変化させて融解温度を測定したところ、濃度依存的に融解温度の上昇が認められ、0.05 mM 以上で一定値に達した。一方、過去に Sm^{3+} との結合が見られた他のタンパク質 XLY について同様の実験を行ったところ、XLY は Algp7 ほど、 Sm^{3+} による融解温度の上昇を示さなかった。これらのことから、Algp7 はある種のレアメタルと強固に結合することが示唆された。

(3) Algp7 のアルギン酸結合に関わる正電荷クラスター

アルギン酸は金属キレート作用を示すため、金属輸送 Efe 系の構成要素である Algp7 のアルギン酸結合能を構造の観点から解析した。X 線結晶構造解析により、Algp7 の高分解能 (1.99Å) の立体構造を決定した（図 4）。

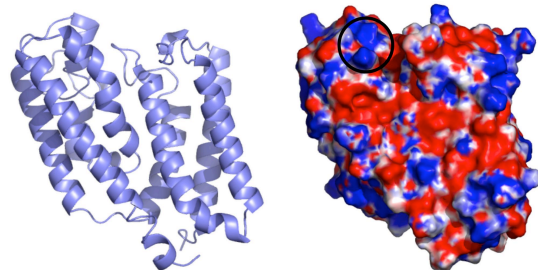


図 4. Algp7 の構造(左:リボンモデル、右:分子表面電荷(丸印:正電荷クラスター))

高分解能の立体構造を用いて、アルギン酸オリゴ糖とのドッキングシミュレーションを行い、その複合体モデルに基づいて、アルギン酸の結合に関わる候補残基を見出した。それらの残基を部位特異的変異により Ala に置換した変異体 E194A、N221A、及び K68A/K69A を作製し、変異体のアルギン酸結合能を紫外吸収法により解析した。野生型と変異体の各タンパク質と種々の濃度のアルギン酸とを反応させて、280nm における吸収スペクトル変化量をアルギン酸濃度に対してプロットし、飽和曲線を作成した。なお、Lys68 と Lys69 の周辺には紫外吸収を示す Trp187 が配置している（図 5）。

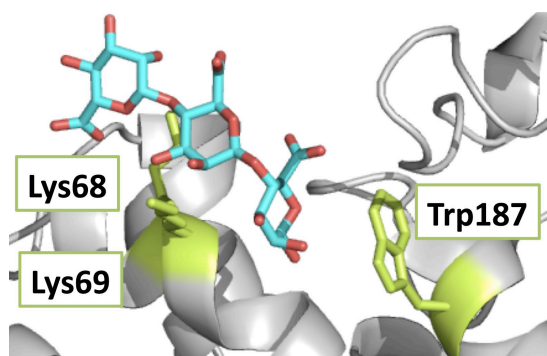


図 5. Algp7 のアルギン酸結合部位

E194A と N221A について、野生型 Algp7 とほぼ同等の結合解離定数が算出されたのに対し、K68A/K69A はアルギン酸低濃度で吸収スペクトルの変化も少なく、飽和曲線も得られないことから、有意な (20 倍以上) 結合能の減少が見られた。このことから、Lys68 と Lys69 はアルギン酸結合に関わる重要な残基であることが示唆された (図 5)。

(4) Algp7 の金属結合に関わる構造要因

Algp7 と金属との結合に関する構造特性を明らかにするため、Zn²⁺ 存在下で Algp7 (Algp7-Zn) の結晶構造を 2.7Å 分解能で決定した。Algp7-Zn において、Zn²⁺ は、Glu79, Glu82, Asp96, Glu178 の四つの酸性残基と結合している (図 6)。興味深いことに、この結合部位は、Site III (His115xxGlu118) と少し離れている。

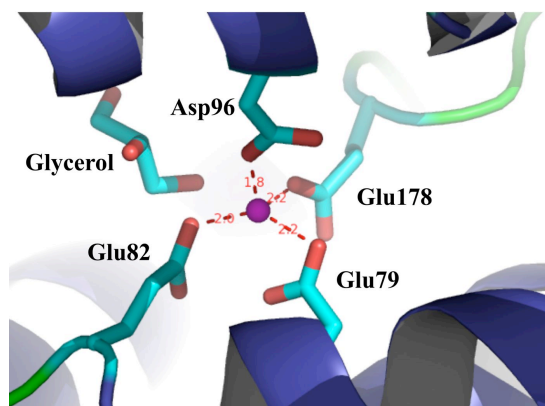


図 6. Algp7 の金属結合部位

【結論】

電子顕微鏡では真空条件下で細胞を解析するため、これまでに生細胞での情報を得ることが困難であった。本研究では、原子間力顕微鏡で A1 株細胞を解析することにより、生細胞での体腔形成を再確認し、そのサイズも計測することができた。さらに、表面電位を測定することにより、体腔とアルギン酸との静電的相互作用について直接的な確証を得ることができた。

アルギン酸結合能を示す Algp7 が Fe²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Cu²⁺に加えて、ある種のレアメタルと結合することが明らかになった。また、構造解析により、Algp7 のアルギン酸と Zn²⁺

の結合部位はそれぞれ正と負に帯電しており、これらの分子表面電荷は金属をキレートしたアルギン酸との結合に重要であると考えられる。

以上の本研究成果から、A1 株細胞は負電荷のアルギン酸を正に帯電した体腔に濃縮し、Algp7 が金属イオンをキレートしたアルギン酸から金属イオンとアルギン酸とを分離し、金属イオンを鉄輸送 Efe 系に、アルギン酸を ABC インポーター系に分配するトライフックコントローラーとして機能することが示唆された。また、A1 株の細胞表層に発現する Algp7 を用いて、レアメタルを含む各種金属を回収できる可能性が示された。

<引用文献>

- ① Braun, V. and Hantke, K.: Recent insights into iron import by bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15, 2011, 328-334
- ② Cao, J., Woodhall, M.R., Alvarez, J., Cartron, M.L., and Andrews, S.C.: EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.*, 65, 2007, 857-875
- ③ Rajasekaran, M.B., Nilapwar, S., Andrews, S.C., and Watson, K.A.: EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *Biometals*, 23, 2010, 1-17
- ④ Momma, K., Mishima, Y., Hashimoto, W., Mikami, B., and Murata, K.: Direct evidence for *Sphingomonas* sp. A1 periplasmic proteins as macromolecule-binding proteins associated with the ABC transporter: Molecular insights into alginate transport in the periplasm. *Biochemistry*, 44, 2005, 5053-5064
- ⑤ Aso, Y., Miyamoto, Y., Harada, K.M., Momma, K., Kawai, S., Hashimoto, W., Mikami, B., and Murata, K.: Engineered membrane superchannel improves bioremediation potential of dioxin-degrading bacteria. *Nat. Biotechnol.*, 24, 2006, 188-189
- ⑥ He, J., Ochiai, A., Fukuda, Y., Hashimoto, W., and Murata, K.: A putative lipoprotein of *Sphingomonas* sp. A1 binds alginate rather than a lipid moiety. *FEMS Microbiol. Lett.*, 288, 2008, 221-226
- ⑦ Niesen, F.H., Berglund, H., and Vedadi, M.: The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat.*

Protoc., 2, 2007, 2212-2221

- ⑧ Maruyama, Y., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., and Murata, K.: Crystal structure of bacterial cell-surface alginate-binding protein with an M75 peptidase motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405, 2011, 411-416

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yukie Maruyama, Takafumi Itoh, Ai Kaneko, Yu Nishitani, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Structure of a bacterial ABC transporter involved in the import of the acidic polysaccharide alginate. *Structure*, 査読有, 23, 2015, 1643-1654
doi: 10.1016/j.str.2015.06.021
- ② Yukie Maruyama, Masahiro Kobayashi, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto: Formation of a single polar flagellum by lateral and polar bacterial flagellar gene sets in *Sphingomonas* sp. strain A1. *Microbiology*, 査読有, 161, 2015, 1552-1560
doi: 10.1099/mic.0.000119
- ③ Kanate Temtrirath, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto: Structural insights into alginate binding by bacterial cell-surface protein. *Carbohydr. Res.*, 査読有, 404, 2015, 39-45
doi: 10.1016/j.carres.2014.11.008
- ④ Ryuichi Takase, Bunzo Mikami, Shigeyuki Kawai, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto: Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 289, 2014, 33198-33214
doi: 10.1074/jbc.M114.585661
- ⑤ Chie Hayashi, Ryuichi Takase, Keiko Momma, Yukie Maruyama, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto: Alginate-dependent gene expression mechanism in *Sphingomonas* sp. strain A1. *J. Bacteriol.*, 査読有, 196, 2014, 2691-2700
doi: 10.1128/JB.01666-14

[学会発表] (計 1 件)

- ① 上西加純、金子あい、丸山如江、水野伸宏、馬場清喜、熊坂 崇、三上文三、村田幸作、橋本 渉: 細菌 ABC トランスポーターの ATP 加水分解は closed 型の基質結合タンパク質との相互作用によって惹起される。

日本農芸化学会関西支部例会 (第 493 回講演会)、2016 年 2 月 6 日、京都大学楽友会館 (京都府京都市)

[図書] (計 0 件)
該当無し

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
該当無し

○取得状況 (計 0 件)
該当無し

[その他]
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 渉 (HASHIMOTO, Wataru)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 30273519

(2) 研究分担者

村田 幸作 (MURATA, Kousaku)
摂南大学・理工学部・教授
研究者番号: 90142299