

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2020

課題番号：17KK0148

研究課題名（和文）有機酸発酵生産の効率化に向けた有機酸排出トランスポーターの基質輸送機構の解明

研究課題名（英文）Study of substrates transport mechanism of organic acid exporter for efficient organic acid production via fermentation process

研究代表者

七谷 圭（NANATANI, KEI）

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：00547333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：微生物を用いた物質生産において、生産物の細胞外への排出は生産効率の律速となりうるプロセスである。本研究では、膜不透過性の有機酸の効率的生産の実現を目標として、細胞外への有機酸の効率的な排出を実現するため、有機酸排出を担うトランスポーターの熱力学的解析と分子構造の解明を行った。はじめに、等温滴定によるトランスポーターと基質結合の際に生じる熱量の測定を試み、熱量の測定に成功した。さらに、X線結晶構造解析による分子構造の解明に向け、結晶の作製とX線回折実験をおこなった。また、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析も実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、地球温暖化や化石資源の枯渇、海洋汚染問題を背景に、排出する二酸化炭素の削減が求められている。有機酸はプラスチックの原料となることから、バイオマスを原料とした有機酸の効率的生産技術の確立は、石油由来プラスチックをより環境にやさしいバイオプラスチックへの置き換えを進める重要な技術となる。膜不透過性の有機酸の生産効率化の鍵を握るのは細胞外への排出であり、本研究の成果は、将来的な有機酸排出の効率化と生産の効率化を実現するための基盤的技術となる。

研究成果の概要（英文）：In microbial production of industrial chemicals, the export of products to extracellular space is one of the rate-limiting factors. In this study, to achieve efficient production of membrane-impermeable organic acids, we performed thermodynamic analysis and structural analysis of the organic acid efflux transporter. First, we tried to determine the thermodynamic parameters by using isothermal titration calorimetry, and succeeded in measuring the heat generated during transporter-substrate binding. In addition, to clarify the molecular structure of organic acid efflux transporter by X-ray crystallography, we carried out crystallization of the purified protein and X-ray diffraction experiments. Single particle analysis using cryo-electron microscopy was also carried out.

研究分野：応用微生物学

キーワード：トランスポーター 有機酸 発酵生産

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化の急速な進行に伴い、二酸化炭素の排出抑制に向けた世界規模の動きが活発化している。従来、石油を原料として生産されてきた化成品等のバイオマス由来への変換は、二酸化炭素排出抑制に向けた重要な課題である。プラスチックは、可塑性に富み、軽く、耐久性があるなど、優れた性質を持つことから、現代社会になくてはならない素材である。しかしながら、プラスチックの原料の大部分は石油に由来しており、バイオマス由来への変換が急務である。プラスチックは、主に各種有機酸と各種アルコールの縮合反応により生産されている。バイオマスを原料に有機酸やアルコールを生産する技術の開発は世界中で行われており、一部は製造販売に至っているものもある。しかしながら、生産コスト面から考えると、バイオマス由来の化成品原料の価格は、石油由来の価格以下に抑えることはできておらず、低コスト化が求められている。このような状況の中で、微生物を用いてバイオマスから有機酸やアルコールを生産する技術は、触媒法にくらべ穏やかな条件下で反応を進められ、消費するエネルギー量を抑えることができる。したがって、環境に優しく、低コスト化が実現できる技術として着目されている。

## 2. 研究の目的

微生物を用いて化合物の生産を実現するため、遺伝子工学的技術を駆使した菌株の改良が、世界中の企業、大学などの研究機関で実施されている。従来の菌株の育種においては、代謝改変や新規生合成経路の導入など、菌体内の生合成反応の改良が中心に行われてきた。しかしながら、有機酸の様に極性が強く膜不透過性の化合物は、生合成された化合物は細胞外に排出されることができずに細胞内に蓄積する。細胞内に蓄積した生産物は、生体内の生合成反応を抑制する負のフィードバック反応を引き起こすことから、細胞外への輸送反応は生合成反応の効率化の視点からも重要な要素である。化合物の細胞外への排出を効率化するためには、目的の化合物を細胞外へ排出する輸送体（トランスポーター、チャンネル）を高発現することが容易に想像できる。しかしながら、膜タンパク質であるトランスポーターやチャンネルは、精製が困難である、機能の解析が困難であるなどの多くの課題があり、ゲノムにコードされている多くの輸送体の機能は明らかにされていない。したがって、目的化合物の細胞外への排出を実現するには、目的化合物を細胞外に排出する輸送体の同定するもしくは、タンパク質工学的な技術により、目的化合物を輸送する輸送体を創り出す必要がある。

本研究では、微生物の菌体内で生産された有機酸の細胞外への排出を効率的に行うため、有機酸排出輸送体の機能を強化することを目的として、有機酸排出輸送体の分子構造と基質輸送メカニズムの解明をめざし下記の研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### ・熱力学的手法による有機酸トランスポーターの機能メカニズムの解析

トランスポーターは膜を介して基質化合物を輸送する。基質輸送の際、基質の結合がトランスポーターの分子構造のダイナミックな変化を引き起こし、基質が膜の反対側に輸送される。トランスポーターの機能メカニズムを理解するためには、構造変化を引き起こす駆動力を明らかにする必要がある。本研究では、等温滴定カロリメトリー(ITC)を用いて、有機酸トランスポーターと基質の結合の際に発生する微量な熱量を測定し結合熱の測定を行った。

### ・有機酸トランスポーターの構造解析

有機酸トランスポーターの基質輸送メカニズムの解明には、分子構造の解明が不可欠である。本研究では、トランスポーターの結晶構造解析を目指し、トランスポーターの結晶化条件の探索、X線回折実験を実施し、高分解能結晶の作製を実施した。また、さらに詳細な基質輸送メカニズムの解明に向けて、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行った。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析は、結晶の作製が必要でなく、複数の異なる分子構造得られる可能性があるため、トランスポーターの基質輸送メカニズムの解明には有力な手法である。

## 4. 研究成果

### ・熱力学的手法による有機酸トランスポーターの機能メカニズムの解析

従来は、精製したトランスポーターをプロテオリポソームに再構成し、トランスポーターによってプロテオリポソームの内部に輸送された放射性基質の量により、トランスポーターの基質輸送を測定することにより、トランスポーターの基質輸送に関する反応力学的な解析を行ってきた。しかしながら、この手法では基質の輸送メカニズムの詳細を明らかにすることはできず、本研究では基質の結合による生じる熱量を計測することにより、基質結合駆動力を同定し、基質輸送メカニズムの解明をめざした。

ITCを用いた熱量の測定には高濃度の精製タンパク質の調製が必要である。トランスポーターを精製、濃縮方法の検討を行った。はじめに、大腸菌を宿主としてトランスポーターHis-tag付加体を発現させるプラスミドを用いて、大腸菌 C43(DE3)株(Lucigen)を形質転換した。得られた形質転換株をLB培地を用いて、30℃で24時間振盪培養した。前培養液を新たなLB培地に添加し、37℃で振盪培養を行いOD 0.5付近でイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを添加し、トランスポーター発現菌体を得た。得られた菌株を高圧破碎装置(Avestin)を用いて破碎し、低速遠心機(Beckman Coulter)により未破碎残渣を除去した。遠心後の上清を超速遠心機(Beckman

Coulter)にかけ膜画分を得た。得られた膜画分を可溶化 buffer に懸濁後、界面活性剤(n-ドデシル-β-D-マルトピラノシド, DDM)を用いて膜タンパク質を可溶化した。可溶化処理後の溶液を再び超遠心(Beckman Coulter)にかけ残渣を除去した後、上清を Ni-NTA カラム(GE healthcare)に供し粗精製画分を得た。粗精製画分をゲルろ過カラムクロマトグラフィー(GE healthcare)に供し、精製画分を得た。精製タンパク質を pH や塩の種類などを変えた様々な buffer 条件下に一定時間おき、再度、ゲルろ過クロマトグラフィーに供することにより、精製タンパク質が安定な buffer 条件を探索した。ITC での熱量の計測には高濃度のタンパク質が必要であるため、安定条件下において、限外ろ過フィルター(メルクミリポア)を用いて精製画分を濃縮した。安定な buffer 条件濃縮したタンパク質と基質の結合の際に発生する熱量を ITC を用いて計測した。その結果、精製タンパク質と基質化合物の結合の際に発生する熱量の計測に成功し、トランスポーターと基質結合を直接的に計測することに成功した。

#### ・有機酸トランスポーターの構造解析

有機酸トランスポーターの分子構造解明に向けて、立体構造認識抗体との共結晶化を進めるため、トランスポーターの構造認識抗体(IgG)からの Fab の調製を行った。立体構造認識 IgG をパラインにより切断後、Fc 領域を ProteinA に吸着させ、Fab 領域のみを精製した。

次に、高分解能結晶の作製に向けて、精製タンパク質を限外ろ過フィルターに供し、濃縮後、結晶化条件スクリーニングキット(MemGold, Molecular Dimensions)を用いて結晶化条件の探索を行った。初期スクリーニングで得られた結晶化条件を基に、buffer の種類、沈殿剤の種類、pH、塩の種類の絞り込みを実施し、結晶化条件の絞り込みを行った。その結果、比較的大きな結晶を得ることができた。しかしながら、得られた結晶について高エネルギー加速器研究機構(KEK, 茨城県つくば市)や大型放射光施設(Spring8)にて、X 線回折実験を実施したところ、結晶の異方性が強く構造の解明には至らなかった。そこで、添加剤スクリーニングキット(Additive Screen, Hampton Research)を用いて、界面活性剤やそのほかの添加剤の添加による結晶の性質の向上を目指した。その結果、添加剤の添加により異方性を解消した結晶の作製に成功した。この結晶を Spring8 に送付し、X 線回折実験を実施したところ 3.2Å の分解能で解析することができた。

トランスポーターの基質輸送メカニズムの解明に向けて、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を進めた。安定条件下で精製したサンプルを、クライオ電子顕微鏡用グリット(Quantifoil)にアブライシ、自動ブランジ凍結装置 Leica EM GP2 を用いて、グリットを作製した。グリットの種類、プロット時間、サンプルのアブライシ量を検討した。グリット作製とクライオ電子顕微鏡による観察を繰り返し、観察に適したグリットの作製条件を決定した。最適条件下でグリットを作製、クライオ電子顕微鏡(Titan Krion, ThermoFisherScientific)を用いて観察を行った。取得した観察データを解析ソフトウェア Relion(MRC)を用いて、Motion collection を行い、cryOLO を用いて単粒子のピックアップを行った。拾い上げた粒子について、Relion を用いて、2D classification, 3D classification を実施し、粒子の選抜後、3D 再構成を行った。その結果、4Å 後半の分解能で分子構造を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kei Nanatani
2. 発表標題 Application of Transporters in Industry & Structural and Functional Studies of a Bacterial Aspartic Antiporter AspT
3. 学会等名 10th Annual CMPR Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井宏太、小笠原諭、村田武士、七谷圭、阿部敬悦
2. 発表標題 Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の構造解析に向けたモノクローナル抗体樹立と AspT-抗体複合体形成の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中 空、宮本 あかり、國井 宏太、七谷 圭、阿部 敬悦
2. 発表標題 醤油乳酸菌Tetragenococcus halophilus由来Aspartate:Alanine 交換輸送体 (AspT) の複合体構造
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	グアン ラン  (Guan Lan)	テキサス工科大・Cell Physiology and Molecular Biophysics・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	テキサス工科大			