

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710239

研究課題名(和文) 微生物ゲノム情報を活用した新規葉酸生合成経路の探索とその全容解明

研究課題名(英文) Study on a novel folate biosynthesis pathway on microorganism

研究代表者

佐藤 康治 (Sato, Yasuharu)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30360928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：葉酸は全ての生物に必須の補酵素である。葉酸の部分骨格であるパラアミノ安息香酸(pABA)はシキミ酸経路中間体より生合成されることが知られている。申請者らはバクテリアゲノムの詳細な解析の結果、pABA生合成に關与する既知遺伝子が欠落したバクテリアを見出した。そのうちpABA原栄養性と考えられた*Lactobacillus fermentum*や*Nitrosomonas europaea*には通常経路とは異なる新規pABA生合成経路の存在が予想された。本研究では、*N. europaea*由来NE1434遺伝子産物がシキミ酸経路中間体を基質せずにde novo合成することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Folate is an essential cofactor in all living cells. para-Aminobenzoate (pABA), a building block of folate, is usually derived from chorismate in the shikimate pathway by reactions of PabA and PabB. We previously suggested that an alternative pathway for pABA biosynthesis would operate in some microorganisms such as *Lactobacillus fermentum* and *Nitrosomonas europaea* since these bacteria showed a prototrophic phenotype to pABA despite the fact that there are no orthologs of pabABC in their genome databases. In this study, a gene of unknown function, NE1434, was obtained from *N. europaea* by shotgun cloning using a pABA-auxotrophic *Escherichia coli* mutant (dpabABC) as a host. A tracer experiment using [¹⁴C]glucose suggested that pABA was de novo synthesized in the transformant. An *E. coli* dpabABCΔaroB mutant carrying the NE1434 gene exhibited a prototrophic phenotype to pABA, suggesting that compounds in the shikimate pathway including chorismate were not utilized as substrates by NE1434.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生体分子化学・生物分子化学

キーワード：葉酸 アミノ安息香酸 ニトロソモナス クラミジア アンモニア酸化菌 偏性細胞内寄生菌

1. 研究開始当初の背景

現在 1000 種を超える生物種のゲノム配列が決定されている。ゲノム情報が蓄積されるにつれ、多数の機能未知遺伝子の存在が認識されるようになった。また、生物個体の維持・増殖に必須で普遍的に存在していると考えられてきた核酸、アミノ酸、補酵素等を合成する一次代謝経路が欠落している生物の存在も認知されるようになった。事実、当研究室では放線菌 *Streptomyces coelicolor* において生命活動に必須な補酵素ビタミン K (メナキノン) 合成経路が欠落していることに気づき、その新規合成経路を発見している (Hiratsuka, T. *et al. Science* **321**, 1670-1673 (2008))。

2. 研究の目的

葉酸は核酸およびアミノ酸合成に關与する全ての生物において必須の補酵素であり、プテリン、パラ-アミノ安息香酸 (pABA) およびグルタミン酸の 3 つの部位から成る化合物である。バクテリアゲノムの詳細な解析の結果、プテリン合成関連遺伝子は存在しているが、pABA 合成に關与する既知遺伝子 *pabABC* 遺伝子の一部または全部が欠落したバクテリアを見出した。これらには pABA 原栄養性と考えられるものもあり、新規合成経路の存在が予想された。

そこで本研究では、既知 pABA 合成遺伝子を持たず、pABA 原栄養性と考えられた *Lactobacillus fermentum* および *Nitrosomonas europaea* に新規 pABA 合成遺伝子を探索し、その全容を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

葉酸はプテリン、pABA およびグルタミン酸より構成される (図 1)。この pABA 合成に關与する新規遺伝子を取得するため、ショットガンクローニングを試みた。DNA 供与体として *L. fermentum* IF03956 および *N. europaea* NBRC14298 (ATCC19718) のゲノム DNA を用い、宿主として *pabABC* 遺伝子を破壊した pABA 要求性 *E. coli* (Kuratsu, M *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7299-7301 (2010)) を用いた。ゲノム DNA を制限酵素 *Sau3AI* にて部分消化した約 7kbp DNA 断片を制限酵素 *BamHI* で処理した pSTV29 ベクター (タカラバイオ社) へ挿入した後、pABA 要求性 *E. coli* を形質転換した。スクリーニングは M9 最少培地での増殖能 (pABA 要求性 *E. coli* は増殖しない) を指標とした。

NE1434 遺伝子ゲノム組み込み株は下記の手順で構築した。NE1434 遺伝子を構成的に発現させるため、上流に *E. coli* リポプロテインプロモーター (P_{lpp} 、Inouye, S *et al.*

Nucleic Acids Res. **13**, 3101 (1985)) を配置した。またこのプロモーター上流に抗生物質テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc^r) を配置しマーカーとして使用した。PCR にて Tc^r - P_{lpp} -NE1434 遺伝子となるように連結した DNA 断片を作成した。本 DNA 断片は pABA 要求性 *E. coli* ゲノム上のトリプトファン分解酵素遺伝子 (*tnaA*) 領域に相同性組換えを利用して挿入した。本株は pABA 要求性が相補されていることを確認した。

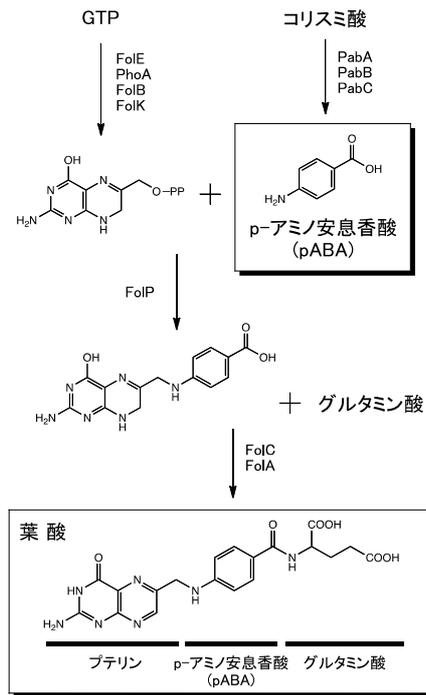


図 1 葉酸の化学構造と既知合成経路

4. 研究成果

L. fermentum ゲノム DNA を DNA 供与体、pABA 要求性 *E. coli* を宿主としてショットガンクローニングを行ったが、pABA 要求性が相補された株は得られなかった。同様に *N. europaea* ゲノム DNA を用いショットガンクローニングを試みたところ、最少培地で増殖能を示す株を十数個得ることができた。それらに含まれるプラスミドを解析した結果、約 7kbp の DNA 断片を含み、それらには NE1431 から NE1434 遺伝子が共通して含まれることがわかった。さらなる詳細な解析より、NE1434 遺伝子が pABA 要求性を相補することを明らかにした。また NE1434 遺伝子を高発現させた pABA 要求性 *E. coli* についてグルコースを炭素源とした M9 最少培地における増殖能を評価したところ、野生型 *E. coli* と同程度まで回復していることもわかった (図 2)。このように NE1434 遺伝子は *E. coli* に悪影響を与えることなく、pABA 合成に關与することが示唆された。

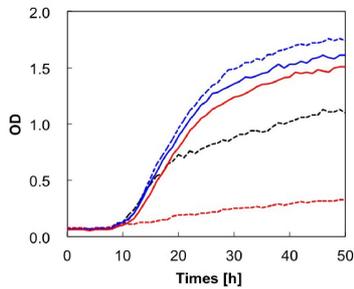


図2 最少培地での *E. coli* の増殖試験
 青破線:空ベクターを有する野生型 *E. coli*
 青実線: NE1434 遺伝子を有する野生型 *E. coli*
 赤破線: 空ベクターを有する pABA 要求性 *E. coli*
 赤実線: NE1434 遺伝子を有する pABA 要求性 *E. coli*
 黒破線: 空ベクターを有する pABA 要求性 *E. coli* (pABA 添加培地)

NE1434 遺伝子について相同性解析 (BLAST 検索) を行ったところ、補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) 合成酵素 PqqC と弱い相同性を示した。PQQ 合成は呼吸器・尿路感染症の原因菌 *Klebsiella pneumoniae* において研究されており、*pqqABCDEF* 遺伝子の関与が報告されている (Puehringer, S. *et al. BMC Biochem.* 9:8 (2008))。 *N. eutropea* が PQQ 合成関連遺伝子を有するか BLAST 検索したが *pqqC* 以外の PQQ 合成関連遺伝子に相同性 (E value $< 10^{-5}$) を示す遺伝子は見出せなかった。従って NE1434 遺伝子は PQQ 合成に関与しないと考えられた。つまり pABA 合成への関与が強く示唆された。

次に NE1434 遺伝子が pABA 生合成に関与することを証明するため、*in vivo* 解析を行った。NE1434 遺伝子を高発現させた pABA 要求性 *E. coli* をグルコース含有 M9 最少培地で培養し、その培養液中に分泌された pABA を LC-MS にて解析した。その結果 $6.1 \pm 0.35 \mu\text{M}$ の pABA を検出することができた。しかしその生産性は低く、前培養液からの持ち込み等の影響を無視できず、*de novo* 合成されていると判断できなかった。そこで炭素源として $^{13}\text{C}_6$ ラベルグルコースのみを含む最少培地を用い、 $^{13}\text{C}_7$ ラベル pABA の生成を指標に検証することとした。その結果を図 3 に示す。図 3 から明らかのように $^{13}\text{C}_7$ ラベル pABA (右下段 青線、 $m/z=145.079$) の生成が確認された。以上より、NE1434 遺伝子産物により pABA が生合成されることが証明された。これは新規 pABA 生合成経路の存在を明らかとした初めての報告であった。

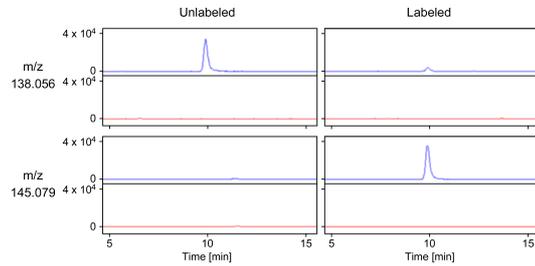


図3 *pabABC* 遺伝子を破壊した pABA 要求性 *E. coli* 培養液の HPLC 解析
 青: NE1434 遺伝子発現株
 赤: コントロール株

この生合成経路を解明するため、*in vitro* 解析を試みた。基質と予想された化合物や補酵素と精製した NE1434 酵素を反応させたが、反応生成物を得ることは出来なかった。現状では基質を予想することは困難なため *in vivo* にて解析することとした。

E. coli はシキミ酸経路を利用して pABA などの芳香族化合物を生合成している。また Porat, I. らは *Methanococcus maripaludis* において、シキミ酸経路中間体である 3-デヒドロキナ酸から pABA が生合成されることを報告している (*Mol. Microbiol.* 62, 1117-1131 (2006))。そこでシキミ酸経路中間体が NE1434 遺伝子産物の基質となるか遺伝子破壊により検証した。シキミ酸経路に關与する *aroB*, *C*, *D* 遺伝子を破壊した pABA 要求性 *E. coli* を構築し、NE1434 遺伝子にて相補されるか、増殖能を指標に評価した。解析の結果、全ての破壊株は pABA 不含最少培地で増殖した。よって NE1434 遺伝子産物はシキミ酸経路中間体を基質としないことがわかった。これは既知 pABA 生合成経路とは全く異なる経路で pABA が生合成されることを示している。

このように NE1434 遺伝子は新規経路での pABA 合成に關与することが明らかとなったため、以下に示した戦略で NE1434 遺伝子産物の基質を探索することとした。まずは *pabABC* 遺伝子を破壊した pABA 要求性 *E. coli* のゲノムへ NE1434 遺伝子を組込んだ pABA 要求性相補株を構築する。この株を突然変異誘発剤ニトロソグアニンで処理し、pABA 要求株を取得する。そしてこの株を宿主、*pabABC* 遺伝子を破壊した pABA 要求性 *E. coli* ゲノム DNA を DNA 供与体としてショットガンクローニングを行い、相補遺伝子情報からその基質を予測する。研究の方法に示したように構築した pABA 要求性相補株をニトロソグアニンで処理し pABA 要求株をスクリーニングしたが、目的株を得ることができなかった。この原因として NE1434 遺伝子産物の基質供給に關与する遺伝子は必須遺伝子であると考

えられた。

次に NE1434 遺伝子オルソログの分布を解析した。PQQ 生合成遺伝子を持たない菌株より、NE1434 遺伝子に対して高い相同性を示す遺伝子を探索、解析した。その結果を図4に示す。図4より、NE1434 遺伝子オルソログは、アンモニア酸化菌および偏性細胞内寄生細菌の2種に見出される特徴的な遺伝子であることがわかった。これら菌株には既知 pABA 生合成遺伝子 *pabABC* が見出されないことから本オルソログが pABA 生合成に関与すると推察された。

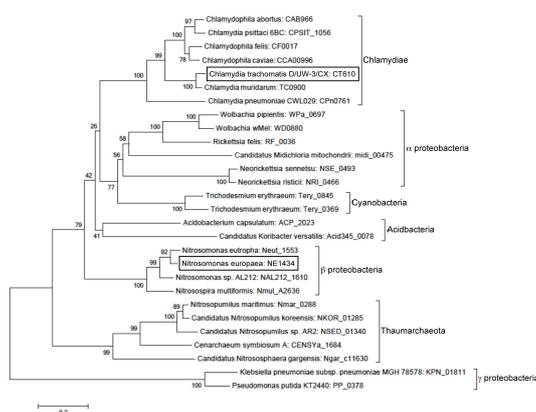


図4 NE1434 遺伝子オルソログの系統樹

偏性細胞内寄生細菌 *Chlamydia trachomatis* における NE1434 遺伝子オルソログ CT610 遺伝子は、動物細胞の腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体に作用しアポトーシスを引き起こす CADD (*Chlamydia* protein associating with death domains) として報告されていた (Stenner-Liewen, F. et al. *J. Biol. Chem.* **277**, 9633 (2002))。しかし *C. trachomatis* 自身における役割は解明されていない。ゲノム情報を精査したところ、CT610 遺伝子は葉酸生合成関連遺伝子クラスターの1つとして存在していると予想された (図5A)。そこで本遺伝子が pABA 生合成に関与することを立証するため、先に示した pABA 要求性 *E. coli* を用いた相補性試験を試みた。図5Bに示したように CT610 遺伝子は pABA 要求性 *E. coli* を相補したことから、pABA 生合成に関与、つまり葉酸生合成関連遺伝子クラスターの1遺伝子として機能していることが分かった。よって、偏性細胞内寄生細菌においても NE1434 遺伝子オルソログが pABA 生合成に関与することが示された。

以上のように、新規 pABA 生合成に関与する遺伝子を発見することができた。しかしその反応機構の解明には至らなかった。本遺伝子オルソログはクラミジア等の病原菌にも見出されたことから、これら病原菌特異的な抗菌剤の開発のターゲットとして有望であ

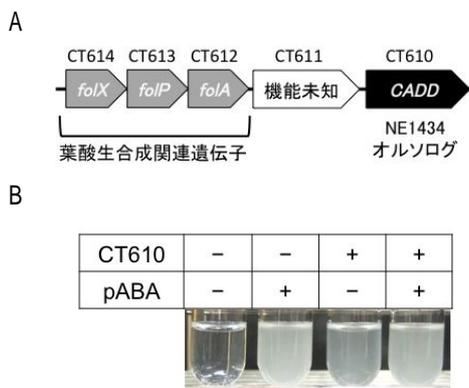


図5 *C. trachomatis* 由来 CT610 遺伝子の解析

り、反応機構解明は医学的にも重要といえる。現在はこれまでとは異なる新たな戦略を考案し、その全容を解明するため研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Satoh, Y., Kuratsu, M., Kobayashi, D., Dairi, T.: New gene responsible for para-aminobenzoate biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **117**(2) 178–183 (2014), doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.07.013. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

佐藤康治、小林大毅、大利徹：バクテリアにおける新規葉酸生合成経路の解明、日本農芸化学会 2013 年度大会 (東北大学、2013 年 3 月 25 日)

SATOH, Y., DAIRI, T.: Novel folate biosynthesis pathway. US-Japan seminar on the biosynthesis of natural products for young researcher (Tokyo Institute of Technology, 2014 年 3 月 2 日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 康治 (SATOH, Yasuharu)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 30360928

(2) 研究協力者

小林 大毅 (OBAYASHI, Daiki)
北海道大学・工学部・学部 4 年

(3) 連携研究者

大利 徹 (DAIRI, Tohru)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 70264679

倉都 将宏 (KURATSU, Masahiro)
協和発酵バイオ (株)・研究員