

令和元年6月6日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04473

研究課題名(和文)多様なレセプターが関与する芳香族化合物の新規外膜輸送システム

研究課題名(英文)A novel outer membrane transport system for aromatic compounds mediated by various TonB-dependent receptors

研究代表者

政井 英司 (Masai, Eiji)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：20272867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性菌における芳香族化合物の外膜輸送については、受動輸送体しか報告されていなかった。本研究では、シデロフォア、ビタミンB12、糖類などの能動輸送に関与することが知られているTonBシステムが、リグニン由来芳香族化合物分解菌 *Sphingobium* sp. SYK-6株のビフェニル型化合物の外膜輸送を担うことを明らかにした。本システムの内、外膜輸送体はTonB-dependent receptorのDdvTであることが明らかとなった。また、内膜に局在しTBDRにプロトン駆動力由来のエネルギーを伝達するTonB複合体は、TonB1、ExbB1、ExbD1から構成されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により初めてTonB-dependent receptorが芳香族化合物の外膜輸送に関与することが明らかにされた。本研究で得られた成果は、グラム陰性菌における芳香族化合物の外膜輸送の解明に大きく貢献するとともに、微生物に新たな芳香族化合物の取り込み能を付与することや基質の取り込み量の適切な制御を可能にすることが期待される。将来的には、細菌による有用物質生産やバイオレメディエーションの高効率化のための新たな技術開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：So far, only passive transporters such as porins and substrate-specific channels had been reported for the outer membrane transport of aromatic compounds in gram-negative bacteria. In this study, we revealed that the TonB system, which is generally involved in the active transport of siderophore, vitamin B12, and saccharides, is responsible for the outer membrane transport of a biphenyl-type lignin-derived compound (5,5'-dehydrodivanillate) in *Sphingobium* sp. SYK-6. In this system, the outer membrane transport is mediated by an outer membrane-localized TonB-dependent receptor (TBDR) encoded by *ddvT*. It is known that the TonB complex localized in the inner membrane plays a role in transmitting the energy derived from the proton motive force to TBDR. This study suggests that among the multiple SYK-6 genes encoding the components of the TonB complex, *tonB1*, *exbB1*, and *exbD1* are involved in the uptake of 5,5'-dehydrodivanillate.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リグニン 芳香族化合物 外膜輸送 バクテリア *Sphingobium*

1. 研究開始当初の背景

申請者は、植物細胞壁の主要成分であるリグニンに由来する様々な低分子芳香族化合物を分解するグラム陰性菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 株の代謝系の詳細を明らかにしてきた。現在、SYK-6 株は世界で最もリグニン由来芳香族化合物の代謝系が明らかにされている細菌であり、本株の代謝系を利用したリグニンからの有用物質生産が期待されている。しかし主要な酵素遺伝子群と全ゲノム配列が明らかにされたものの、本株がどのように多様なリグニン由来芳香族化合物を細胞内に取り込むかについてはほとんど分かっていなかった。これまでにグラム陰性菌の芳香族化合物の取り込みは、内膜の輸送システムを中心に研究が行われ、major facilitator superfamily 輸送体、ATP-binding cassette 輸送体、tripartite ATP-independent periplasmic 輸送体、そして申請者らが初めて報告した tripartite tricarboxylate 輸送体様システムの関与が明らかにされてきた。一方、外膜輸送体は、ポーリン、基質特異的チャネル、能動輸送体の 3 つに分類されるが、芳香族化合物の取り込みへの能動輸送体の関与は知られていなかった。

2. 研究の目的

Sphingobium sp. SYK-6 株ゲノム中には、芳香族化合物を取り込む既知のポーリンや基質特異的チャネルと有意な相同性を示す遺伝子としてポーリン遺伝子が 1 つしか存在しない。一方で 74 個もの TonB-dependent receptor (TBDR) 様遺伝子を有していた。TBDR は、内膜局在性の TonB-ExbB-ExbD 複合体から伝達されるプロトン駆動力由来のエネルギーを利用し、外膜において基質特異的な輸送を行う (TonB システム)。現在までに、TonB システムはシデロフォア、ビタミン B12、糖類などの輸送に関与することが報告されているが、本システムの芳香族化合物代謝における基質の外膜輸送への関与は知られていない。SYK-6 株が多様なリグニン由来芳香族化合物の代謝に特化したバクテリアであることを考慮すると、これらの TBDR 様遺伝子がリグニンに由来する多様な芳香族化合物を特異的に取り込む外膜トランスポーターをコードすることが予想された。本研究では、SYK-6 株に存在する TBDR 様遺伝子から、リグニン由来芳香族化合物での培養時に特異的に転写が誘導される遺伝子を同定し、当該遺伝子の基質外膜輸送への関与の有無を調べ、輸送に関わる TonB システムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ解析

SYK-6 株を 10 mM sucrose, 10 mM glutamate, 0.13 mM methionine, 10 mM proline を含む Wx 最少培地 (Wx-SEMP 培地) で菌体の光学密度が 0.5 ($OD_{600} = 0.5$) になるまで培養した。本培養液に 2 mM または 5 mM のリグニン由来芳香族化合物を加え、さらに 6 h または 2 h 培養した。基質を添加しないでさらに 2 h 培養したものを対照とした。各培養で得られた細胞から全 RNA を単離し、cDNA の合成後、Cy3 と Cy5 で標識した。ハイブリダイゼーションおよびスポットのスクリーンと定量は以前の報告に従い (Takahashi et al., 2015)、各リグニン由来芳香族化合物存在下と非存在下での培養時における各遺伝子の発現パターンを比較した。

(2) 遺伝子破壊株の作製

各遺伝子上流と下流それぞれを含む約 1 kb の DNA 断片を PCR で増幅し、遺伝子の内部が欠失した形で pAK405 (Kaczmarczyk et al. 2012) に連結した。各プラスミドを SYK-6 株に導入して破壊株の候補を得た。遺伝子の破壊はコロニー PCR によって調べた。

(3) DdvT の変異解析

DdvT の推定 TonB box 中のアミノ酸に変異プライマーを用いた inverse PCR によってアラニン変異を導入した。TonB box 変異 *ddvT* を持つプラスミドを *ddvT* 破壊株に導入し、DDVA での生育能、DDVA 変換能、および DDVA 取り込み能を測定した。

(4) 生育試験

SYK-6 株、遺伝子破壊株および相補株を LB で培養し、得られた菌体を 5 mM の DDVA、シリリングアルデヒド、シリリング酸、バニリン、バニリン酸、プロトカテク酸 (20 mg/l methionine を添加)、フェルラ酸を含む Wx 最少培地に OD₆₀₀ が 0.2 になるように植菌し、30°C で振盪培養した。細胞の生育は OD₆₀₀ を経時的に測定することで調べた。TonB box 変異体の生育能は 1 mM DDVA を含む Wx 寒天培地を用いて評価した。

(5) 基質変換実験

SYK-6 株と遺伝子破壊株および相補株を LB で培養し、得られた菌体を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) に懸濁した。OD₆₀₀ が 0.5、2.0 または 5.0 の菌体懸濁液を調製し、100 μM または 200 μM のリグニン由来芳香族化合物とインキュベートした。経時的にサンプリングを行い、遠心分離によって反応を停止させた。遠心後の上清を液体クロマトグラフィーによって分析し、各基質の変換を調べた。

(6) 基質取り込み能の解析

本研究で開発した *lacZ* をレポーター遺伝子とする DDVA 取り込みアッセイ用プラスミド pS-XR を SYK-6 株、遺伝子破壊株および相補株に導入し、LB で培養した。得られた菌体を Wx 培地で洗浄後、0.1、1.0 または 5.0 mM の DDVA を含む Wx-SEMP 培地に OD₆₀₀ が 0.2 になるように植菌した。その後、3 h 培養し、β-galactosidase 活性を測定した。

(7) Western blot 解析

SYK-6 株および遺伝子破壊株を LB で培養し、OD₆₀₀ が 0.5 に達した時に 1 mM DDVA を加えてさらに 12 h 培養を行った。細胞を集菌後、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で洗浄し、同 buffer に懸濁した。細胞をソニケーションにより破壊し、細胞抽出液を得た。細胞抽出液について 18,800 g、10 min の遠心を行い、上清を 120,000 g、60 min 遠心することにより全膜画分を調製した。全膜画分を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写し、常法に従って Western blotting を行った。一次抗体には抗 DdvT 抗体を用い、二次抗体には peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen) を用いた。検出は ECL Western blotting detection system (GE Healthcare) を用いて化学発光検出装置により行った。抗 DdvT 抗体は、DdvT の部分合成ペプチドを抗原に用いて得られた抗 DdvT ウサギ抗血清から精製して調製した。

(8) 細胞内局在性解析

内膜タンパク質マーカーとして利用するために、C 末端に His tag を融合した *tonB2* を pJB861 に連結したプラスミド (pJB-tonB2His) を作製した。本プラスミドを導入した SYK-6 株を *m-tolate* を含む LB で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養した。全膜画分は上述の方法により、外膜画分は橋下らの方法 (Hashimoto et al., 2005) に従って調製し、これらの画分について抗 DdvT 抗体および抗 His tag 抗体を用いた Western blotting を行った。

4. 研究成果

(1) 推定 TBDR 遺伝子の DNA マイクロアレイ解析

SYK-6 株は、芳香族化合物の外膜輸送への関与が報告されている *ompW* 様遺伝子をゲノム中に 1 つ有していたが、この遺伝子の破壊はバニリン酸や DDVA を含むリグニン由来芳香族化合物での生育に影響を示さなかった。既知の TBDR 遺伝子と SYK-6 株が有する 74 個の推定 TBDR 遺伝子とのアミノ酸配列に基づく系統樹を作成したところ、半数以上の推定 TBDR 遺伝子は、機能既知の TBDR 遺伝子とは異なる 2 つの clade に分類され、これらが未知の機能を有すると予想された。

DNA マイクロアレイ解析によってリグニン由来芳香族化合物により転写誘導を受ける TBDR 様遺伝子を同定した。その結果、 β -アリールエーテル型化合物、フェニルクマラン型化合物、ビフェニル型化合物など、様々なリグニン由来芳香族化合物の存在下での培養時に特異的に 2-35 倍の誘導を受ける TBDR 様遺伝子が 17 個見出された。本研究では、DDVA により約 4.8 倍の転写誘導を受ける TBDR 様遺伝子 (*ddvT*; 実績報告書では *tbtA* としていたが、本報告書で名称を変更)に着目し、以後の解析を行った。

(2) DDVA 外膜輸送体遺伝子の同定

BOCTOPUS2 プログラムにより、DdvT は TBDR に特徴的な 22 回膜貫通型の β -バレル構造を形成することが予測された。また、N 末端にはシグナル配列の存在が予測され、その直後にプラグドメイン様の配列を有していた。

1 mM DDVA の存在下または非存在下で培養した SYK-6 株、*ddvT* 破壊株 (Δ *ddvT*)、*ddvR* 破壊株 (Δ *ddvR*)から調製した全膜画分に対して、抗 DdvT 抗体を用いた Western blotting を行った。その結果、 Δ *ddvT* では DdvT のバンドは観察されなかったが、野生株の DDVA 培養時に *ddvT* の発現が強く誘導されていた。また、 Δ *ddvR* では、DDVA の有無によらず *ddvT* が野生株の DDVA 誘導時と同等以上に発現したことから、*ddvT* の発現は DdvR によって制御されることが示された。

DDVA を含む各リグニン由来芳香族化合物を唯一の炭素源としたときの Δ *ddvT* の生育能を測定したところ、DDVA 特異的に大幅な生育遅延が観察された。また Δ *ddvT* の休止細胞のリグニン由来二量体化合物の変換能を野生株と比較したところ、DDVA の変換能だけに欠損が見られた。DdvR の転写制御メカニズムを利用した DDVA 取り込みアッセイ系を開発し、 Δ *ddvT* の DDVA 取り込み能を評価した。*ddvR* およびベクター内の *lacZ* 上流に DdvR の結合領域である *ligXa* プロモーター領域を pSEVA225 (Silva-Rocha et al., 2013)に挿入したレポータープラスミド pS-XR を導入した株において *lacZ* は DdvR によって負に制御される。DDVA が細胞内に取り込まれると、DdvR による発現抑制が解除されるため、LacZ 活性によって間接的に細胞内の DDVA を検出することができる。本法を用いて Δ *ddvT* の DDVA 取り込み能を測定したところ、100 μ M DDVA 添加時において DDVA 取り込み能を完全に欠損していた。しかし、1 mM および 5 mM DDVA では取り込み能がそれぞれ野生株の 20%と 40%存在したことから、高濃度 DDVA 存在下では他の輸送体も DDVA 外膜輸送に関与することが示唆された。また、 Δ *ddvT* にプラスミドで *ddvT* を相補すると、DDVA 生育能、変換能、取り込み能に回復が見られた。以上の結果から DdvT が DDVA の取り込みに関与することが明らかとなった。

TBDR の N 末端には、TonB との相互作用部位である TonB box が保存されている。SYK-6 株が有する全ての TBDR 遺伝子の推定アミノ酸配列の N 末端配列を比較すると、ほぼ全てに X-X-V-T (X は疎水性アミノ酸)が保存されており、DdvT には IIVT 配列が存在した。SYK-6 株の TBDR で特に保存性の高い V42 と T43 に対してアラニン変異を導入し、その影響を調査した。その結果、それぞれに単独でアラニン変異を導入した場合、生育能と DDVA 変換能に有意な低

下が観察された。T43 変異体は、DDVA 取り込み能についても有意な低下を示した。さらに V42 と T43 の両方にアラニン変異を導入した場合、 $\Delta ddtT$ と同等まで DDVA 取り込み能、生育能、変換能が低下した。したがって、DdvT の TonB box と推定される V42 と T43 は DDVA の取り込みに重要であることが示された。

DdvT の細胞内局在性を明らかにするために、pJB-tonB2His を導入した SYK-6 株培養菌体から全膜画分と外膜画分を調製した。得られた画分に対して、抗 DdvT 抗体と抗 His tag 抗体を用いた Western blotting を行った結果、TonB は全膜画分でのみ検出されたのに対して、DdvT は全膜画分と外膜画分の両方から検出された。以上全ての結果から、DdvT は DDVA の外膜輸送体であると結論された。

(3) DDVA 外膜輸送に関与する TonB 複合体成分遺伝子の同定

SYK-6 株は、TBDR ヘプロトン駆動力由来のエネルギーを伝達する TonB をコードすると推定される遺伝子をゲノム中に 6 つ有していた (*tonB1-tonB6*)。また、その他の TonB 複合体の成分遺伝子である *exbB* 様遺伝子を 2 つ (*exbB1* と *exbB2/tolQ*)、*exbD* 様遺伝子を 3 つ有していた (*exbD1*、*exbD2* と *exbD3/tolR*)。これらの内、*tonB1-exbB1-exbD1-exbD2* はオペロンを形成していた。6 つの *tonB* について破壊株の作製を試みたところ、*tonB2-tonB6* の破壊株が取得された。しかし *tonB1* については破壊株の取得には至らず、本遺伝子が SYK-6 株の生存に必須な遺伝子である可能性が考えられた。 $\Delta tonB2-\Delta tonB6$ の各破壊株について、DDVA での生育能と変換能を測定した結果、 $\Delta tonB2$ のみで顕著な低下が観察された。しかし $\Delta tonB2$ は DDVA だけでなく、他のリグニン由来芳香族化合物を炭素源とした場合や LB においても生育の遅延を示した。また、 $\Delta tonB2$ は DDVA の取り込みアッセイにおいて高い LacZ 活性を示した。これらの結果から、 $\Delta tonB2$ においては DDVA 変換能が低下し、DDVA が細胞内に蓄積したことが推定された。DDVA 分解の初発反応を担う DDVA O-デメチラーゼの成分は鉄イオンを含んでおり、*tonB2* の直下流にはシデロフォアの取り込みに関与する TBDR と相同性を示す遺伝子が存在することから、TonB2 は鉄イオンの取り込みに関与すると考えられた。*tonB3-tonB6* の各破壊株では DDVA での生育能と変換能に野生株との差異は見られなかったが、複数の TonB が DdvT と相互作用する可能性も考えられたため、これら 4 つの *tonB* の多重破壊株を作製し、DDVA での生育能と取り込み能を測定した。その結果、野生株との差異は観察されなかったことから、*tonB1* が DDVA の外膜輸送に主要な役割を担うことが予想された。そこで、*tonB1* を高発現させた SYK-6 株の DDVA 変換能を測定したところ、野生株と比較して変換速度が約 1.4 倍に上昇した。さらに、*tonB1-exbB1-exbD1-exbD2* または *tonB1-exbB1-exbD1* を発現させた SYK-6 株の DDVA 変換能は *tonB1* だけを高発現させた場合よりも約 1.2 倍高かった。一方で、*tonB2* の高発現は DDVA 変換能に影響しなかった。以上の結果より、DDVA の輸送には TonB1、ExbB1 および ExbD1 が関与することが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Kosuke Mori, Koh Niinuma, Masaya Fujita, Naofumi Kamimura, Eiji Masai, Applied and Environmental Microbiology、査読有、84(20), 2018, e01314-18. DOI: 10.1128/AEM.01314-18.

② Kosuke Mori, Naofumi Kamimura, Eiji Masai, Applied Microbiology and Biotechnology、査読有、102(11), 2018, 4807-4816. DOI: 10.1007/s00253-018-8988-3

〔学会発表〕 (計 19 件)

① 森光佑、藤田雅也、新沼阜、上村直史、政井英司、第 63 回リグニン討論会 (2018)

② 藤田雅也、森光佑、上村直史、政井英司、第 63 回リグニン討論会 (2018)

- ③ Eiji Masai, Gordon Research Conference: Lignin (2018)
- ④ Masaya Fujita, Kosuke Mori, Naofumi Kamimura, Eiji Masai, Gordon Research Conference: Lignin (2018)
- ⑤ 藤田雅也、森光佑、上村直史、笠井大輔、福田雅夫、政井英司、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016)
- 〔その他〕
- ホームページ等
- <http://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-l/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：城所 俊一
ローマ字氏名：KIDOKORO, Shun-ichi
所属研究機関名：長岡技術科学大学
部局名：工学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：80195320

研究分担者氏名：笠井 大輔
ローマ字氏名：KASAI, Daisuke
所属研究機関名：長岡技術科学大学
部局名：工学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80452085

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。