

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14237

研究課題名(和文)バクテリア多面体オルガネラのバイオ・ナノ反応器への応用のための基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for the application of bacterial polyhedral organelle for bio-nano-reactor

研究代表者

飛松 孝正(Tobimatsu, Takamasa)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・准教授

研究者番号：30188768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：かなりの数の細菌はアルデヒドのような毒性で揮発性の中間体を生じる代謝を、タンパク性の殻からなる多面体構造体(オルガネラ)の中で行っている。本研究ではこのオルガネラをバイオナノリアクターとして用いるための道を拓くために、オルガネラタンパク質間の相互作用部位を探索した。その結果、代謝の鍵酵素であるジオールデヒドラターゼの および サブユニットのN末端領域とPduPアルデヒド脱水素酵素のN末端領域がオルガネラ酵素との相互作用部位であることを見出した

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の多面体構造体の中に酵素群を詰め込めばナノスケールのバイオリアクターとして用いられると期待されている。そのためには詰め込みシグナルの同定が必要であるが、これまでの研究ではオルガネラの殻タンパク質と相互作用する2つの領域がシグナルとして同定されているだけであった。本研究は殻内部のオルガネラ酵素間の相互作用に関わるペプチド領域を明らかにしたものである。これらのペプチドや、同等の機能を持つペプチドを用いれば、様々な酵素類をオルガネラに組み込むことが可能になると考えられることより、本研究はバイオナノリアクターの実現に大いに寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Considerable number of bacteria have proteinaceous polyhedral organelle in which metabolic reactions are carried out minimize the loss of volatile metabolic intermediates. In this study, we have searched for the interaction regions between enzymes of the pdu organelle. Short N-terminal regions of medium and small subunit of diol dehydratase and PduP aldehyde dehydrogenase is shown to be required for the interaction between organelle enzymes.

研究分野：工学

キーワード： pduオルガネラ 多面体オルガネラ ナノバイオ バイオリアクター

1. 研究開始当初の背景

原核生物はオルガネラをもたないといわれていたがカプシド様で 100 nm 程度のタンパク性多面体オルガネラをもつものがある。光合成細菌のカルボキシゾームや、*Salmonella* や *Klebsiella* などの *pdu* オルガネラや *eut* オルガネラである。これらのオルガネラは揮発性代謝中間体を閉じ込めて代謝を円滑に進めている。オルガネラは酵素や代謝中間体の濃縮効果を備えており、バイオナノ反応器への応用が欧米で期待されている。2000 年代には、*pdu* オルガネラや *eut* オルガネラの殻タンパクの立体構造の論文が *Science* 誌を賑わせていた。さらに 2008 年に *pdu* オルガネラの大腸菌での発現系が、近年はジオールデヒドラターゼ (PduCDE) のサブユニットである PduD の N 末端領域や PduP プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼの N 末端領域が *pdu* オルガネラへの移行シグナルであることが報告されている。しかし、シグナルをもたないオルガネラ酵素の組込み機構の解明は不明で、残された課題であった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、ジオールデヒドラターゼのサブユニットとサブユニットの N 末端領域が相互作用することでジオールデヒドラターゼが低溶解性になることや、ジオールデヒドラターゼと他の *pdu* オルガネラ酵素とが相互作用することを見出していた。本研究では、オルガネラ酵素の会合に関わる領域を同定するとともに、オルガネラの殻タンパク質の大腸菌での発現系を開発する。さらにその技術を用いて、この多面体オルガネラをナノ反応器に応用するための道を拓く。

3. 研究の方法

(1) *pdu* オルガネラタンパク質の相互作用部位の解析

ジオールデヒドラターゼや PduP, PduQ などのオルガネラ蛋白質の相互作用領域と予想された領域の発現プラスミドを作成し、それらの間の相互作用を His タグと Ni カラムの相互作用を用いたプルダウンアッセイにより解析した。

(2) クレブシラオキシトカおよびサルモネラエンテリカの *pdu* オルガネラの殻タンパク質の発現系の開発

クレブシラオキシトカ *pdu* オルガネラの殻タンパク質をコードする *pduA*, *pduB*, *pduJ*, *pduK*, *pduM*, *pduN*, *pduT*, *pduU* の 8 つの遺伝子はすでに単離済みであるので、それらを pET21b ベクターの T7 プロモーターの下流に連結して組み込むことで、発現ベクターを作成した。サルモネラエンテリカの *pdu* オルガネラ殻タンパク質の発現系はゲノム DNA を鋳型として PCR により殻タンパク質をコードする *pduA*, *pduB*, *pduJ*, *pduK*, *pduM*, *pduN*, *pduT*, *pduU* の 8 つの遺伝子を増幅してクローニングし、さらに pET21b ベクターの T7 プロモーターの下流に連結して組み込むことで、発現ベクターを作成した。これらの発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、IPTG 添加により大量発現させた。

4. 研究成果

(1) ジオールデヒドラターゼの および サブユニットの N 末端領域の相互作用様式の解析

ジオールデヒドラターゼがオルガネラへの組込みシグナル部位をもつことと自己集合能をもつことより、*pdu* オルガネラ酵素のオルガネラへの組込みの中心的役割を担っていると考えられる。そこで、ジオールデヒドラターゼの自己集合を担っていることが示されているサブユニットの N 末端領域とサブユニットの N 末端領域の相互作用が同種間で働くのか異種間で働くのかを調べた。His タグを付加した N 末端領域を Ni カラムに結合させて、N 末端領域を付加したイソクエン酸脱水素酵素との相互作用をプルダウンアッセイにより解析することで、サブユニットとサブユニットの N 末端領域が同種間だけでなく、異種間とも相互作用していることを明らかにした。

(2) ジオールデヒドラターゼ サブユニットの N 末端領域の相互作用部位の解析

これまでサブユニットの N 末端領域 60 アミノ酸残基を相互作用の解析に用いていた。タグとして用いるには小さいペプチド領域の方が望ましいので、短いペプチド領域の発現系を作成して相互作用に必要な領域を調べた。アミノ酸配列の相同性などを考慮して N 末端より 20、40、46 アミノ酸残基をもつペプチド領域を可溶性 4 量体酵素のアルデヒド脱水素酵素や可溶性 2 量体酵素のイソクエン酸脱水素酵素のサブユニットの N 末端に付加して、相互作用による溶解性の低下の度合いを調べることで、相互作用の強さを見積もった。その結果、最も強い相互作用能をもつのは N 末端 20 アミノ酸残基領域であり、これまで最も強い相互作用能をもつと考えられていた N 末端 60 アミノ酸残基領域の強さは N 末端 40 や 46 アミノ酸残基の領域と同程度であり、N 末端 20 アミノ酸残基領域の相互作用能よりも弱い結果であった。このことは、サブユニットの N 末端 20 アミノ酸残基領域が相互作用に重要であり、それ以降の配列は相互作用に阻害的に働くことを示唆している。

(3) オルガネラ酵素間相互作用の部位の解析：ジオールデヒドラターゼ側

オルガネラ酵素の多くがジオールデヒドラターゼと直接相互作用していることがプルダウンアッセイにより示されていた。そこで、この相互作用がジオールデヒドラターゼの自己集合に関与する および サブユニットの N 末端領域によるものであるかどうかを調べた。

His タグを付加したジオールデヒドラターゼの サブユニットや サブユニットの N 末端領域を Ni カラムに結合させて、オルガネラ酵素タンパクとの相互作用をプルダウンアッセイで調べたところ、PduL のホスホトランスアシラーゼと PduO のコバラミンアデノシルトランスフェラーゼ、PduP アルデヒド脱水素酵素との間に明瞭な相互作用が見られた。そこで、His タグを付加した PduL や PduO、PduP を用いて、ジオールデヒドラターゼの サブユニットや サブユニットの N 末端領域を付加したイソクエン酸脱水素酵素との相互作用をプルダウンアッセイにより解析したところ、PduL や PduO は および サブユニットの N 末端領域の両方との間に、PduP では サブユニットの N 末端領域との間に明瞭な相互作用が見られた。これより、ジオールデヒドラターゼの サブユニットおよび サブユニットの N 末端領域がオルガネラ酵素との相互作用を担うことが示された。

(4) オルガネラ酵素間相互作用の部位の解析：オルガネラ酵素側の解析

次にオルガネラ酵素側の相互作用部位を検索した。オルガネラ酵素のバイオインフォマティクス解析より、酵素の N 末端アミノ酸領域が相互作用部位であると予測されていたので、これらの領域によるジオールデヒドラターゼとの相互作用をプルダウンアッセイにより解析した。PduP アルデヒド脱水素酵素の N 末端 19 アミノ酸残基の有無に依存したジオールデヒドラターゼとの相互作用が確認された。さらに、ジオールデヒドラターゼの サブユニットや サブユニットの N 末端領域を付加したイソクエン酸脱水素酵素との相互作用を解析したところ、PduP の N 末端 19 アミノ酸残基とジオールデヒドラターゼの サブユニットの N 末端領域が相互作用することが示された。以上より、オルガネラ酵素間の相互作用部位としてジオールデヒドラターゼの サブユニットや サブユニットの N 末端領域および、PduP アルデヒド脱水素酵素の N 末端 19 アミノ酸残基が機能することが明らかとなった。

(5) クレブシラオキシトカの pdu オルガネラの殻タンパク質の発現と解析

クレブシラオキシトカ pdu オルガネラの殻タンパク質遺伝子 (*pduABJKMNTU*) の発現系の構築を行ない、大腸菌 BL21(DE3) で大量発現させたところ、PduA や PduB に相当するタンパク質が遠心後の沈殿画分に得られた。そこで、この発現系からの殻多面体オルガネラの精製法を検討した。すでに pdu オルガネラの精製法が確立しているサルモネラの遠心分離法を用いる精製法を試したところ、pdu オルガネラが沈殿しないはずの 3,300 × g で、発現した殻タンパク質のほとんどが沈殿した。大腸菌での発現条件や細胞の破碎条件等を種々検討したものの、同じ結果であった。これらの結果は封入体の形成や PduA や PduB の発現で見られる巨大自己集合体の形成を示唆していたので、クレブシラオキシトカの代わりに精製法が報告されているサルモネラの pdu オルガネラを用いることにした。

(6) サルモネラエンテリカの pdu オルガネラの殻タンパク質の発現と解析

サルモネラエンテリカゲノム DNA を鋳型にして pdu オルガネラ殻遺伝子群を PCR 法によりクローニングして pduABJKMNTU 遺伝子の発現系を構築した。これを大腸菌に導入して大量発現させて得られた細胞破碎液を遠心分離したところ、文献と同じ 12,000-20,000 × g での沈殿画分にオルガネラ殻遺伝子産物が得られたことより、殻多面体オルガネラが形成されたものと考えられた。次に発現したオルガネラへの外来酵素の組み込みを確認する実験を行った。組み込みの確認は、外来酵素に細胞質プロテアーゼの分解シグナルである SsrA タグを付加してもオルガネラ内部に組み込まれれば消化されないことを利用した。組み込む酵素として大腸菌細胞質酵素のイソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) を選び、オルガネラ移行シグナルと SsrA タグとを付加して共発現させて、細胞質画分とオルガネラ画分中の ICDH の分解状況を観察した。大腸菌の培養条件を種々検討したものの、オルガネラ画分に存在する ICDH のみが細胞質プロテアーゼによる分解から保護されていることを明確に示す結果を得られなかった。そこで、オルガネラ形成のポジティブコントロールとして、サルモネラの pdu オペロン遺伝子の PCR クローニングと大腸菌での発現系の作成を進めた。ただ、増幅する pdu オペロンが約 18 Kb と長く、増幅条件の検討や変異の除去に手間取り、やっとな変異のない発現系の構築ができたところである。

以上より、オルガネラへの外来酵素の組み込みに用いることができると考えられるいくつかの相互作用領域を明らかにすることができた。今後は、これらをタグに用いた外来酵素を殻タンパク質と共発現させて殻への組み込み効率を確認することが必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Site-Specific Integration by Recruitment of a Complex of Φ C31 Integrase and Donor DNA to a Target Site by Using a Tandem, Artificial Zinc-Finger Protein. Sumikawa T, Ohno S, Watanabe T, Yamamoto R, Yamano M, Mori T, Mori K, Tobimatsu T, Sera T.

Biochemistry. 2018 Dec 18;57(50):6868-6877. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00979. Epub 2018 Dec (査読あり)

(2) Cleavage of influenza RNA by using a human PUF-based artificial RNA-binding protein-staphylococcal nuclease hybrid. Mori T, Nakamura K, Masaoka K, Fujita Y, Morisada R, Mori K, Tobimatsu T, Sera T. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Oct 28;479(4):736-740. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.142. Epub 2016 Sep 28. (査読あり)

(3) Diol Dehydratase-Reactivase Is Essential for Recycling of Coenzyme B12 in Diol Dehydratase. Toraya T, Tanokuchi A, Yamasaki A, Nakamura T, Ogura K, Tobimatsu T. Biochemistry. 2016 Jan 12;55(1):69-78. doi: 10.1021/acs.biochem.5b01023. Epub 2015 Dec 24. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3件)

(1) 池田溪太、平田佳久、森光一、世良貴史、虎谷哲夫、飛松孝正、補酵素 B12 関与 diol dehydratase および サブユニットの N 末領域による低溶解性化能の解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)

(2) 北川優輔、世良貴史、森光一、飛松孝正、カラム不要でシンプルな活性のあるタンパク質の究極の精製法:単量体酵素への拡張、BMB2015 2015.12.1-4

(3) 斉藤拓也、荒木優貴乃、柴田千尋、世良貴史、森光一、虎谷哲夫、飛松孝正、*Klebsiella oxytoca pdu* オペロンを発現させた大腸菌組換え体の機能解析、BMB2015 2015.12.1-4

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名：森 光一

ローマ字氏名：Mori, Koichi

所属研究機関名：岡山大学

部局名：ヘルスシステム統合科学研究科

職名：助教

研究者番号 (8桁)：5 0 3 7 9 7 1 5

研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。