

も詳細まで解析されているのに対して、L-グルコースは自然界に存在しないとされ、生物はL-グルコースを代謝しないと考えられてきた。しかしながら両化合物は物理・化学的性質は同一であり、L-グルコースが化学構造上、"難分解性"である訳ではない。また、生命誕生以前の化学進化の過程でグルコースが生み出されたとしたら、過去の地球にはL-グルコースが存在していた可能性も考えられる。

2. 研究の目的

著者らはこの"グルコース資化のホモキラリティー"に挑戦するため、L-グルコース代謝能を有する微生物を自然界から分離し、複数の属に属するバクテリアを取得した。本研究では、その中から *Paracoccus* sp. 43P 株を選択し、そのL-グルコース代謝機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) L-glucose dehydrogenase (L-GDH)の精製

43P 株の細胞抽出液中に見いだされたL-GDH 活性を指標に、常法に従って同酵素を精製した。

(2) L-GDH 遺伝子 (*lgdA*) のクローン化と周辺領域の解析

精製L-GDHの部分アミノ酸配列をもとに、PCR をベースとした方法により *lgdA* 遺伝子を同定した。さらに primer walking 法によるPCR 増幅・塩基配列解析により、周辺領域の配列を決定した。

(3) L-gluconate dehydrogenase (L-GnDH)の精製と遺伝子の同定

前述と同様に、43P 株の細胞抽出液中に見いだされたL-GnDH 活性を指標に同酵素を精製し、遺伝子の同定・周辺領域の配列解析を行った。

(4) 各遺伝子の*E. coli*を宿主とした異種発現

及び酵素精製

上記で同定したL-GDH、L-GnDH 及びその周辺遺伝子の ORF を pET21a または pET28a にクローン化し、*E. coli* BL21(DE3) 株を宿主として、C 末端または N 末端に His-tag を付加する形で発現させた。さらに常法に従って His-tag に対する affinity を用いて各酵素の精製を行った。

(5) 各酵素の酵素活性の同定

各精製酵素を用いて、予想される酵素活性の検出を行った。基質には市販の糖・アルドロン酸類またはそれらを化学反応及び酵素反応により変換した化合物を用い、反応条件及び活性検出には各酵素に適した方法で行った。

(6) 酵素反応生成物の同定

一部の酵素反応生成物に関しては、TLC を用いた精製後、HPLC 解析、GC/MS 解析、あるいは ^1H -、 ^{13}C -NMR 解析を行うことによって、同定を行った。また、ピルビン酸・D-グリセルアルデヒド-3-リン酸 (Gap) については、それぞれに特異的な酵素を用いた検出法により同定した。

(7) 43P 株の遺伝子破壊株の作製

43P 株の遺伝子破壊株の作製は、*E. coli* S17-1 λ pir 株との接合伝達により行った。すなわち、pBBR1MCS2 由来の *mob* 領域を pUC19 にクローン化したプラスミドに、破壊遺伝子領域を含む DNA 断片をクローン化し、各 ORF 内に Km 耐性遺伝子を挿入した。このプラスミドを接合伝達により 43P 株に導入し、Km 耐性で遺伝子破壊株を選択した。遺伝子破壊の確認は PCR により行った。

(8) 代謝酵素の系統学的解析

同定した各代謝酵素のアミノ酸配列を元に KEGG ゲノムデータベースでオルソログを検索した。高い相同性を示したオルソログ酵素および各代謝酵素の属する protein family

の代表的な酵素を含めて系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) L-グルコース代謝の初発酵素 L-GDH の同定

43P 株の細胞抽出液を用いて L-グルコースを基質とする酵素活性を検討したところ、NAD⁺依存的な L-GDH 活性のみが検出された。そこで本酵素(LgdA)を精製し、部分アミノ酸配列から遺伝子を同定したところ、*lgdA* は同属のゲノム解読株である *P. denitrificans* の Pden_1680 と 84% の相同性を示し、また inositol 代謝に関連すると推定される遺伝子群とクラスターを成していることが判明した(図 1A)。実際に LgdA は L-グルコースよりも *scyllo*-inositol に対して強い活性を示した。

LgdA の L-グルコースからの反応産物は、HPLC 及び NMR 解析の結果から L-gluconate であることが示された。このことから LgdA は L-グルコースの 1 位を酸化して L-glucono-1,5-lactone を生成し、それが水溶液中で非酵素的に L-gluconate へ変換されていることが明らかになった。

(2) L-gluconate 以降の代謝経路----*lgn* cluster の発見

続いて 43P 株の細胞抽出液を用いて L-gluconate を基質とした酵素活性を検討したところ、再び NAD⁺依存的な L-GnDH 活性が検出された。そこで前述と同様に同酵素遺伝子を同定したところ、L-GnDH 遺伝子(*lgnH*) は 9 つの遺伝子からなるクラスター(*lgn* cluster とする)内に存在していた(図 1A)。またこのクラスターの上流には、逆向きに転写調節因子と考えられる遺伝子(*lgnR*)が存在し、このクラスターの発現調節を行っていることが推定された。クラスター内の遺伝子は、やはり *P. denitrificans* の Pden_4924 ~ Pden_4932 と 70-90% 程度の相同性を示し、これらの annotation は、上流より ABC transporter

(LgnA-D)、galactarate dehydratase (LgnE)、2-keto-3-deoxygalactonate (KDGal) kinase (LgnF)、KDGal-phosphate (KDPGal) aldolase (LgnG)、alcohol dehydrogenase (L-GnDH; LgnH)、及び short chain oxidase/reductase (LgnI)であった。この結果より、このクラスター内の遺伝子産物により L-gluconate 以降の代謝がなされることが推定されたので、LgnE~LgnI について酵素レベルで解析を行い、反応産物の同定を行った。

① LgnH

予想通り LgnH は L-GnDH 活性を示した。LgnH の反応産物は 5-keto-L-gluconate であり、LgnH は L-gluconate の 5 位を酸化することが明らかになった。

② LgnI

LgnI は、LgnH の反応産物である 5-keto-L-gluconate に対して NADPH 依存的な還元活性を示した。反応産物は D-idonate であり、LgnI は 5 位のカルボニル基を還元する酵素であることが示された。また、LgnH、LgnI による酸化還元反応により、L-gluconate を D-idonate へと変換する、D/L 変換を行っていることが明らかになった。

③ LgnE

LgnE は D-idonate を基質として反応させると、還元性の化合物へと変換することが示された。反応産物を同定したところ KDGal と一致したので、LgnE は D-idonate の 2 位と 3 位の炭素から水分子を引き抜く D-idonate dehydratase として機能することが明らかになった。

④ LgnF と LgnG

LgnF と LgnG については annotation 通りの活性を有しているかどうかについて検討した。すなわち、LgnF については KDGal と ATP を基質として反応させた場合に、ATP の減少を指標にキナーゼ活性を確認し、LgnG につ

いては LgnF の反応産物(KDPGal)を基質としてピルビン酸と Gap が生じることを、既知酵素とのカップリング反応により確認した。

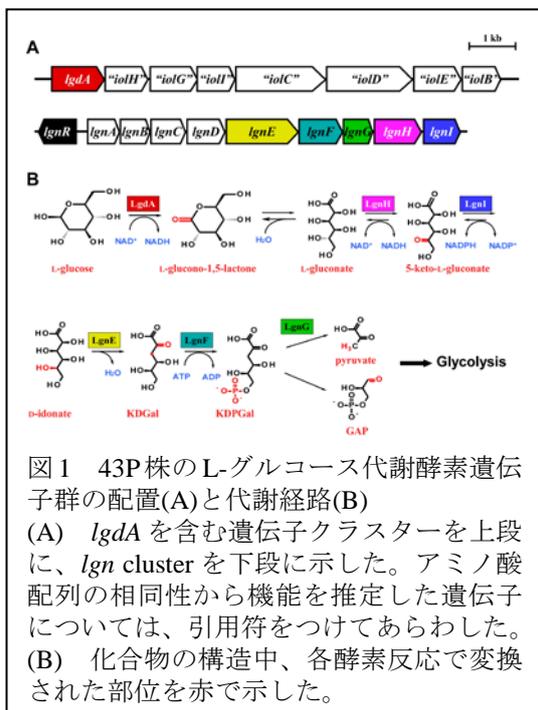


図1 43P株のL-グルコース代謝酵素遺伝子群の配置(A)と代謝経路(B)
 (A) *lgdA* を含む遺伝子クラスターを上段に、*lgn* cluster を下段に示した。アミノ酸配列の相同性から機能を推定した遺伝子については、引用符をつけてあらわした。
 (B) 化合物の構造中、各酵素反応で変換された部位を赤で示した。

(3) L-グルコース代謝の全体像

以上の解析により明らかになった43P株のL-グルコース代謝経路を図1Bに示す。この代謝経路は、遺伝子配置からLgdAによるL-グルコースの初発酸化と*lgn* cluster内の酵素によるL-gluconate以降の代謝に分けられる。

LgdAは前述のように、inositol代謝関連遺伝子群とクラスターを成しており、*scyllo*-inositolに対して強い活性を示したが、実際に*lgdA*破壊株はL-グルコースおよび*scyllo*-inositolに対する資化性が極端に低下していた。このことからLgdAは両化合物の資化に必須であることが示された。なお、既知の*scyllo*-inositol dehydrogenase (枯草菌のIolX、IolW)はほとんどL-グルコースを基質としないので、LgdAはこれらの酵素とは異なる基質認識をしている可能性が考えられる。

L-gluconate以降の代謝経路は、以前に報告された大腸菌のL-galactonate代謝経路と類似の反応によって構成されていた。ところが両

代謝経路の酵素は互いに20-30%程度の低い相同性しか示さず、さらに*lgnH*、*lgnI*、*lgnE*の各破壊株はL-gluconate資化能は失うものの、L-galactonate資化に関しては全く影響を及ぼさなかった。このことから、*lgn*酵素群はL-gluconateに特異的な代謝酵素であると考えられる。

同定した各代謝酵素のアミノ酸配列を元に系統解析を行ったところ、各代謝酵素は機能既知の酵素とは系統的に大きく異なる上、*P. denitrificans*由来の酵素を除くと、ゲノム配列より明らかになった酵素とも深い位置で分岐していることが示された。特にLgnE、LgnH、LgnIは、*Paracoccus*属とは系統分類上異なるバクテリア由来の酵素とクラスターをなしており、この代謝経路が進化的に興味深いものであることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① 中村 颯、L-グルコース代謝機構の発見、バイオサイエンスとインダストリー、71、150-152、2013。(査読なし)

② T. Shimizu, N. Takaya and A. Nakamura. An L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* species 43P. *J. Biol. Chem.*, **287**, 40448-40456, 2012.(査読有) 10.1074/jbc.M112.403055

[学会発表] (計13件)

① 清水哲、中村颯、*Paracoccus* sp. 43P株のL-gluconate代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月25日、東北大学(仙台)

② 清水哲、中村颯、*Paracoccus* sp. 43P株のL-gluconate代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析、日本農芸化学会関東支部2012年度大会、2012年10月27日、新潟薬科大学(新潟)

③ 清水哲、高谷直樹、中村顕、*Paracoccus* 属細菌 43P 株の L-グルコース代謝経路、第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会、2012 年 9 月 29 日、理研 SPring-8(兵庫県佐用町)

④ 清水哲、高谷直樹、中村顕、*Paracoccus* 属細菌 43P 株の L-グルコース代謝経路、2012 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2012 年 9 月 1 日、焼津グランドホテル(焼津)

⑤ T. Shimizu, N. Takaya, and A. Nakamura. L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* sp. 43P. American Society for Microbiology 112th general meeting, 2012 年 6 月 19 日、San Francisco (USA)

⑥ 深野 和紘、清水哲、牧遼、佐々木康幸、中村顕、矢嶋俊介、*Paracoccus* sp. 43P 由来 L-グルコース代謝経路酵素の立体構造解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、平成 23 年 3 月 23 日、京都女子大学 (京都)

⑦ 清水 哲、高谷直樹、中村顕、*Paracoccus* sp. 43P 株の L-グルコース代謝経路、日本農芸化学会 2012 年度大会、平成 23 年 3 月 23 日、京都女子大学 (京都)

⑧ T. Shimizu, N. Takaya and A. Nakamura. An L-glucose metabolic pathway in *Paracoccus* sp. 43P. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月 7 日、札幌コンベンションセンター (札幌)

⑨ 深野和紘、清水哲、佐々木康幸、中村顕、矢嶋俊介、L-グルコース代謝の初発酵素 L-GDH の結晶構造解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都)

⑩ 清水哲、高谷直樹、中村顕、*Paracoccus* sp. 43P の L-グルコース代謝経路、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都)

⑪ T. Shimizu, N. Takaya, A. Nakamura. L-glucose dehydrogenase, the first enzyme for

L-glucose metabolism in *Paracoccus* sp. 43P. 110th General Meeting, American Society for Microbiology, 平成 22 年 5 月 26 日、San Diego Convention Center, San Diego (USA)

⑫ 清水哲、中村顕、高谷直樹、L-グルコース代謝の初発酵素 L-GDH の酵素学的解析、2010 年度日本農芸化学会大会、平成 22 年 3 月 30 日、東京大学(東京)

⑬ 清水哲、高谷直樹、中村顕、L-グルコース資化細菌の代謝機構の解明、2009 年度日本農芸化学会関東支部大会、平成 21 年 10 月 31 日、玉川大学(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 顕 (NAKAMURA AKIRA)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：10207863

(3)連携研究者

高谷 直樹 (TAKAYA NAOKI)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：50282322