

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22580082
 研究課題名（和文） 新規チオシアネート取り込み輸送体の機能的構築および共役活性評価
 研究課題名（英文） Expressional and functional characterization of the novel transporter protein related to thiocyanate ion uptake
 研究代表者
 荒川 孝俊（ARAKAWA TAKATOSHI）
 京都大学・医学研究科・研究員
 研究者番号： 30523766

研究成果の概要（和文）： ABC 型膜輸送体のそれぞれのコンポーネントと相同性を持っている、チオシアネート加水分解酵素下流にコードされる 4 種類の遺伝子配列の翻訳産物について、実際に活性を持った輸送体として得られるかどうかを大腸菌と酵母を宿主とする組換え発現系を用いて検討した。細胞質内ヌクレオチド結合ドメインにあたる遺伝子産物は、大腸菌・酵母いずれにおいても高効率に発現したのに比べ、細胞外ドメイン、細胞膜ドメインの遺伝子産物はごく微量な発現にとどまった。

研究成果の概要（英文）： Thiocyanate hydrolase (SCNase) operon contains four unidentified genes at downstream of the ones encoding the respective subunits of SCNase. The current research aimed at substantial characterization of the gene products using bacterial and yeast recombinant expression system. To date, while putative nucleotide binding domain expressed as a soluble protein at considerable amount, the other three products yielded at lower level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 農芸化学、応用微生物学

キーワード： 微生物代謝

1. 研究開始当初の背景

チオシアネート(SCN⁻)は、天然には植物の外敵防御分子として植物や乳汁に含まれてお

り、あるいは化学工業で排出される硫黄化合物の無害化処理産物として生産される。その後大気中に放出されて硫黄循環サイクルに入るまでの間に土壤中に蓄積され、土壤中の

硫黄代謝細菌による生物的分解を経る。産廃処理場の活性汚泥から単離された *Thiobacillus thioparus* THI115 は、SCN⁻を唯一のエネルギー源として増殖することができる化学合成無機栄養細菌(グラム陰性細菌)であり、SCN⁻を CO₂ および SO₄²⁻ に分解する過程においてエネルギーを獲得する。微生物の SCN⁻ 分解経路は学術的な興味のみならず、環境浄化(バイオレメディエーション)への応用という観点からも国内外で盛んに探求されてきた。

SCN⁻ 生分解経路として、シアナーゼを介したシアン酸経路が従来から知られていたが、*T. thioparus* ではこれとは異なり、チオシアネート加水分解酵素(SCNase)および下流代謝酵素によって、硫化カルボニル(COS)を中間生成物とした経路(COS経路)をたどることが発見された。その実体である酵素の単離(Katayama *et al.* J Biol Chem 1993)以来、その遺伝子の塩基配列決定が本邦において報告されている。またその後のゲノム解析により、幾つもの細菌で同酵素の存在が確認されるに至っている。

一方で、SCN⁻ 分解経路では課題開始時点において、SCN⁻ の環境から細胞内への移行に関する情報が不足していた。SCN⁻ は3原子からなる小分子であるが、マイナスに荷電したイオンであるために、細胞膜の疎水性領域を通過することは極めて困難であると考えられる。すなわち、SCN⁻ をペリプラズム空間から取り込む何らかの機構が備わっていなければ代謝経路は合理的に説明されないが、その実体同定と詳細な研究には着手されていなかった。

2. 研究の目的

T. thioparus の SCNase の遺伝子構造に注目すると、その下流に ABC(ATP-binding cassette) 輸送体と明らかな相同性をもつ遺伝子群(orf2,3,4,5 と呼ぶ)が位置しオペロン構造を形成していた。ABC 輸送体はヌクレオチド加水分解反応と共役して機能する生物普遍的な透過装置であり、基質結合サブユニットを含む4本のペプチド鎖が存在するなど

インポーター型 ABC 輸送体に特有な遺伝子構造を示すことから、上記遺伝子産物がイオン透過を促進する機能を担っているものと考えられる。そこで本課題では同イオンの既知代謝経路を拡張し、細胞外から内へ向けたチオシアネート移動を説明するモデルを考察する第一歩として、この遺伝子産物がチオシアネート取り込み輸送体を構成するとの仮説を立て、輸送体を機能的複合体として構築する条件の確定および活性測定系の確立と活性確認を通じた分子同定を行うことを目標として設定し、orf2-5 遺伝子産物を組換え DNA の手法を用いて発現させ、それらを機能的複合体として組織化するための条件探索を進めた。

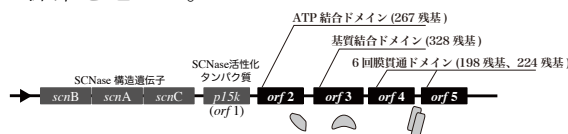


図: SCNase オペロンの遺伝子構造

3. 研究の方法

該当蛋白質の発現コンストラクトの作成と発現確認は次のような方針で行った。研究対象がバクテリア由来の蛋白質であるため、原則として大腸菌や酵母を宿主とした大量発現系を試みた。プロテアーゼ切断サイトとポリヒスチジンタグ配列をそれぞれの C-末端に加えるようにして設計し、大腸菌では遺伝子を pET 等の T7 プロモータ制御性のベクターに組み込んだ。出芽酵母では 2 μ 系ベクターの組換え系を採用し、GAL1 プロモータ下流に配列を挿入してガラクトースによる誘導発現を行えるように構築した。また組換え発現効率を上げるため、蛋白質の機能に重要なコア領域以外の部分についての欠失体を用いた検討、複数遺伝子の共発現、フォールディングを上げるための温度条件、可溶化タグ配列付加についても検討を行った。

(1) 核酸結合ドメインの発現

orf2 産物は 267 アミノ酸からなる可溶性タンパクと予想され、ATP 加水分解蛋白質に

特有な Walker A および B モチーフ、signature モチーフ、switch 領域などが全て確認されることから、サイトプラズム側に局在し核酸結合ドメイン(NBD)を形成すると考えられた。まず、この全長配列を大腸菌 (BL21(DE3) 株) や酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* FGY217 株) に組み込み大量発現系を構築した。いずれの宿主においても良好な発現量を示したが、可溶性蛋白質としては発現せず、大部分は封入体あるいは不溶性画分に獲得された。そこで、ABC 輸送体間で配列相同性の低い C-末領域 (regulatory domain; RD) を切除して発現を行ったところ、その大部分を可溶性画分へと移行させることに成功した。

(2) 輸送基質結合ドメイン(SBD)の発現

orf3 産物は 478 アミノ酸残基からなる球状蛋白質と予想される配列を有し、NBD や TMD と比べてグループ内相同性が低いことから、各々の輸送基質を結合する細胞外ドメインに相当すると仮定された。これを orf2 と同様な方法で発現を行ったところ、大腸菌・酵母いずれの宿主においても遺伝子産物は不溶性画分へと発現した。大腸菌における pelE、酵母における α -MF といったシグナル配列を明示的に付加して膜外移行の促進を試みたが、可溶化性状に大きな変化は見られなかった。しかし、グアニジンまたはグアニジン・アルギニン巻戻し系を適用することにより 1/3 前後の収率で可溶性画分内に獲得できるようになることが確認された。

(3) 膜貫通ドメイン(TMD)の発現

膜貫通サブユニットを考えられている orf4 および orf5 の産物はそれぞれ 198 残基、224 残基のアミノ酸からなり、6 箇所ずつ合わせて 12 の膜貫通ヘリックスを持っているものと考えられた。まず大腸菌宿主を用いて膜画分における発現量の検討を行ったところ、汎用の染色試薬感度以下の発現量であったため、配列の C-末側に GFP を融合した形状でコンストラクトを再構築し、蛍光検出による膜画分の可溶化粗精製画分での発現探索を行った。この検討の際には酵母宿主も加え、さらに各遺伝子の末端配列を切除した変

異体を用意し比較を行った。その結果大腸菌で全長発現させた場合で収量が最も高く、GFP 蛍光強度から見積もられる発現量は orf4 で 100 $\mu\text{g/L}$ 、orf5 で 20 $\mu\text{g/L}$ であり、精製を進めるに際しては膜移行シグナル配列の最適化など、さらなる発現量向上への取り組みが必要であると判断された。なお、orf5 については遺伝子の読み枠シフトを考慮すると既解読配列より 3' 下流側に遺伝子配列が続くことも考えられることが判明した。そのため、完全長配列の獲得を行った上での再検討が必要とされる。

(4) 発現条件の向上・最適化

① 全長配列の同時発現

orf2 や orf3 については一定の発現が確認されたものの、想定していた可溶性の発現ではなく不溶性画分に発現すること、また 2 つの TMD については予期していたとおりの収量が得られていない。これは複合体を構成しないためにそれぞれのコンポーネントについて正しいフォールディングが達成されないことが起因となるものと考えられた。そこで各遺伝子発現系を別個に構築した場合に加えてポリシストロニック発現系として構築した場合における発現を確認するため、orf2-5 それぞれを別個のクローニングサイトに組み込んだものとオペロン全体を一つのクローニングサイトへ組み込んだものを準備した。これらを用いて発現局在を比較したところ、顕著な局在変動は見られなかった。すなわち orf2、orf3 産物は膜画分へと移行することはなかったことから、TMD との複合体はこの時点で形成されていないことが示唆された。

② 発現条件の最適化

可溶性ドメイン(orf2, orf3)の発現条件最適化を培養温度(10°C-37°C)、培養時間(数時間-数日)、培地組成(天然培地や合成培地)、発現誘導のタイミングなどをパラメータとして行った。orf2(N-末側ドメイン)においては 5 mg/L 超に発現量が上昇した。また低温誘導プロモータ制御下に置いた低温発現を行うことで orf3 産物の収率が改善し、不溶性画分からの回収量でおよそ 1mg/L 程度まで増加

することを見出した。ここで orf4 遺伝子を同時に組み込み共発現による改善を試みたが、発現プロファイルに大きな変動は生じなかった。

4. 研究成果

本課題により SCNase オペロン遺伝子産物の一部の構成要素について現実に単離獲得できるレベルでの発現条件を得るなど、組換え生産を達成するための緒口となる知見が得られた。引き続き、①残る遺伝子産物の大量発現・共発現と収量最適化、②複合体形成と構造形成確認、③輸送体の活性測定系の確立を順次推進し、輸送体蛋白の結晶化を目指した大量発現に進め、有機アニオン取り込み機構の詳細な理解に近づけたいと考えている。加えて輸送体タンパクと加水分解酵素の共役活性測定系が確立されることで COS 経路を無細胞的にシミュレート・定量化し、環境の硫黄化合物循環システム理解に貢献する手段に道が開かれるものと期待される。

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 1 件)

①Yasuaki Yamanaka, Takatoshi Arakawa, Toshinori Watanabe, Satoshi Namima, Masa Sato, Shota Hori, Akashi Ohtaki, Keiichi Noguchi, Yoko Katayama, Masafumi Yohda, Masafumi Odaka, Two arginine residues in the substrate pocket predominantly control the substrate selectivity of thiocyanate hydrolase、Journal of Bioscience and Bioengineering、査読有、Vol. 116、Issue 1、2013、pp. 22-27、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.013

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒川 孝俊 (ARAKAWA TAKATOSHI)
京都大学・医学研究科・研究員
研究者番号：30523766

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし