

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780083

研究課題名(和文) マイコバクテリウム属細菌が有するユニークな酸化酵素の機能解析と応用

研究課題名(英文) Characterization of mycobacterial novel monooxygenases and their application to biocatalysis

研究代表者

古屋 俊樹 (Furuya, Toshiki)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：20367064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌由来の二核鉄型酸化酵素はユニークかつ有用な反応を触媒するが、異種の細胞内で発現させることが困難であり、このことが応用を妨げている原因の1つになっている。本研究では、Mycobacterium属細菌由来二核鉄型酸化酵素の異種発現に成功した。当該酸化酵素の活性発現にはタンパク質の立体構造形成を補助するシャペロニンタンパク質が不可欠なことを明らかにした。本研究における新規シャペロニンタンパク質の発見は、本ファミリー酸化酵素の異種発現や応用に大きなブレークスルーをもたらす可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bacterial binuclear iron monooxygenases play numerous physiological roles in oxidative metabolism. Monooxygenases of this type found in actinomycetes also catalyze various useful reactions and have attracted much attention as oxidation biocatalysts. However, difficulties in expressing these multicomponent monooxygenases in heterologous hosts have hampered the development of engineered oxidation biocatalysts. Here, we succeeded in functionally expressing the mycobacterial binuclear iron monooxygenase in heterologous hosts. We found that a specific chaperonin played essential roles in the active expression of the monooxygenase. The strategy developed here should be generally applicable to the heterologous expression of other actinomycetous binuclear iron monooxygenases, and will accelerate the development of engineered oxidation biocatalysts for industrial processes.

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：酸化酵素 放線菌 異種発現 シャペロニン 生体触媒

1. 研究開始当初の背景

微生物が芳香族化合物などの炭化水素をどのように変換するかを明らかにすることは、生態系における物質循環の解明という基礎的な観点からのみならずバイオレメディエーションや生体触媒などの応用的な観点からも重要である。

*Mycobacterium goodii* 12523 株および *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株はフェノールをパラ位選択的に酸化してヒドロキノンに変換するというユニークな活性を有している(図1)。これらの *Mycobacterium* 属細菌は炭素源としてフェノールを利用することはできないが、アセトンを利用することができる。興味深いことにフェノールに対する酸化活性はアセトンにより強く誘導される (Appl Microbiol Biotechnol, 46, 432 (1996))。

これまでに申請者は、*M. goodii* 12523 株および *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株においてフェノールに対するパラ位選択的酸化活性をコードする遺伝子 *mimABCD* を同定することに成功している(図1) (Appl Environ Microbiol, 77, 1214 (2011))。具体的には、*mimA* 遺伝子の破壊および相補により *mimABCD* が当該酵素活性をコードしていることを明らかにした。また、*mimA* 破壊株はアセトンを炭素源として利用する能力も失っていた。さらに申請者は、*mimA* の上流にレギュレーター遺伝子 *mimR* が存在することを明らかにし、MimR タンパク質はアセトン存在下で *mimABCD* の転写を活性化することを確認した (J Bacteriol, 77, 1214 (2011))。これより、酸化酵素 MimABCD の生理機能はアセトンなどの代謝(酸化)であり、偶発的にフェノールに対するパラ位選択的酸化活性も有しているという興味深い結果が明らかとなった。MimABCD は生態系におけるアセトンなどの循環において重要な役割を担っている可能性があり、また生体触媒としての応用の観点からも有用な酵素である。しかしながら、MimABCD がアセトンの代謝において具体的にどのような役割を担っているかについてはまだわかっていない。また、生体触媒として応用するためには活性を向上させることが重要である。

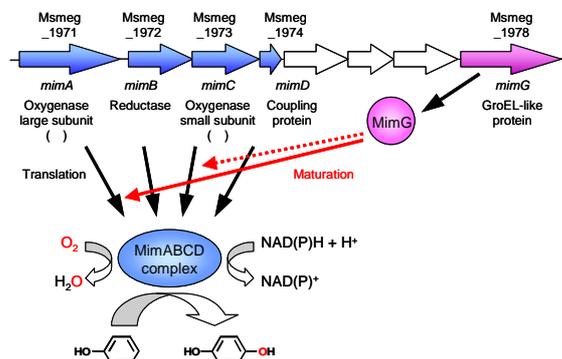


図1 *Mycobacterium* 属細菌由来二核鉄型酸化酵素の遺伝子クラスターと触媒機能

2. 研究の目的

本研究では、*mimABCD* を異種の宿主内で高発現させ、MimABCD の機能を詳細に解析することと生体触媒への応用を図ることを目的とした。MimABCD に代表される放線菌由来の二核鉄型酸化酵素を異種細胞内で発現させることは困難となっており、本研究は当該酵素の活性発現メカニズムを明らかにするうえでも重要である。

3. 研究の方法

(1) *mimABCD* 遺伝子の放線菌における発現

*M. goodii* 12523 株および *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株由来 *mimABCD* 遺伝子を放線菌発現ベクター pTip-QC2 (産総研、田村具博教授より分譲) に連結した。また、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株由来 *mimG* 遺伝子 (Msmeg\_1978) を PCR により増幅後、pTip-RT2 ベクター (産総研、田村具博教授より分譲) に連結した。作製した組換えプラスミドを放線菌 *Rhodococcus opacus* B-4 株 (大阪大学、大竹久夫教授、本田孝祐准教授より分譲) に導入して MimABCD の異種発現を試みた。

具体的には、形質転換した放線菌を LB 培地で培養し、発現をチオストレプトンにより誘導後、菌体を回収して各種分析に供した。タンパク質発現は、SDS-PAGE およびウエスタンブロットングにより分析した。酵素活性は、菌体をフェノールと反応させた後、HPLC により反応生成物のヒドロキノン定量することにより測定した。

(2) *mimABCD* 遺伝子の<sup>大腸菌</sup>における発現

*M. goodii* 12523 株由来 *mimA* 遺伝子および *mimC* 遺伝子を大腸菌発現ベクター pRSFDuet-1 に、*mimB* 遺伝子および *mimD* 遺伝子を pETDuet-1 ベクターに連結した。また、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株由来 *mimG* 遺伝子 (Msmeg\_1978) を pCDFDuet-1 ベクターに連結した。作製した組換えプラスミドを *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3)pLysS 株に導入して MimABCD の異種発現を試みた。

具体的には、形質転換した大腸菌を LB 培地で培養し、発現を IPTG により誘導後、菌体を回収して各種分析に供した。タンパク質発現は、SDS-PAGE により分析した。酵素活性は、菌体をフェノールと反応させた後、HPLC により反応生成物のヒドロキノン定量することにより測定した。また、菌体をアセトンと反応させた後、GC-MS により反応生成物の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) *mimABCD* 遺伝子の放線菌における発現

*mimABCD* 遺伝子の異種発現を *Mycobacterium* 属細菌と近縁の *Rhodococcus* 属細菌を宿主として試みた。具体的には、*mimABCD* を pTip ベクターに連結し、*Rhodococcus opacus* B-4 株に導入した。しかしながらフェノール酸化活性は検出されず、既

報と同様に異種発現が困難なことを実感した。SDS-PAGEによりタンパク質の発現状況を確認したところ、オキシゲナーゼラージサブユニット MimA が不溶化しており、このことが酸化活性を示さない原因の1つであると推定した。

*mimABCD* 以外にも必要な因子が存在する可能性を予想して、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株のゲノム配列上において *mimABCD* 遺伝子クラスター周辺領域の配列を解析したところ、その下流に GroEL ファミリーのシャペロニンタンパク質と相同性を示す ORF、Msmeg\_1978 が存在するのを見いだした(図1)。Raoらは最近、この *Mycobacterium* 属細菌には3つの GroEL シャペロニン様タンパク質が存在することを推定している(T. Rao, et al., FEMS Microbiol. Lett., 310, 24 (2010))。1つはバイオフィーム形成に必要な Msmeg\_1583、もう1つは生育に不可欠な Msmeg\_0880、そしてもう1つが *mimABCD* の下流に存在する Msmeg\_1978 であるが、Msmeg\_1978 に関しては“is not likely to be significant”と記述されており、機能未知で重要視されていない。申請者は、Msmeg\_1978 に相当する遺伝子が MimABCD の立体構造形成、さらには活性発現に関与しているのではないかと予想した。

そこで、*mimG* と命名した Msmeg\_1978 に相当する遺伝子をクローニング後、*mimABCD* とともに *R. opacus* B-4 株に導入して活性を評価した。その結果、*mimG* を共発現させることにより *mimABCD* にコードされているフェノール酸化活性を異種細胞内で発現させることに成功した。さらに、SDS-PAGE およびウェスタンブロットングによりタンパク質の発現状況を確認したところ、細胞内で MimG を共存させるとオキシゲナーゼラージサブユニット MimA が可溶化することを見いだした(図2)。これより、MimABCD の酸化活性を異種細胞内で再構成するためには、MimA の立体構造形成を担うシャペロニンタンパク質 MimG の存在が不可欠ことが明らかとなった(図1)。MimA は活性中心を有するサブユニットであり、精巧な触媒機能を発揮する二核鉄を形成するために MimG の補助が必要なのかもかもしれない。

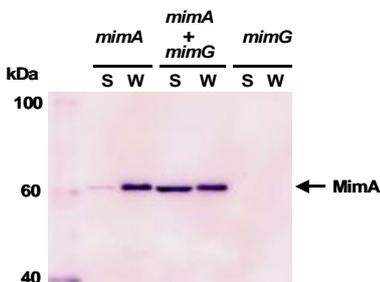


図2 MimA タンパク質発現のウェスタンブロットング解析  
横軸は *R. opacus* B-4 株に導入した遺伝子を示し、S は可溶性画分、W は全細胞画分を示す。

## (2) *mimABCD* 遺伝子の *大腸菌* における発現

*Mycobacterium* 属細菌と近縁の *Rhodococcus* 属細菌内で *mimABCD* 遺伝子を発現させることができたので、属種の大きく異なる *大腸菌* を宿主とした異種発現にも挑戦した。*大腸菌* 発現のメリットとして、菌体の増殖速度が高いことや高発現システムが整っていることが挙げられ、生体触媒への応用に向けて高いポテンシャルを有している。*mimABCD* および *mimG* を各遺伝子に分割して3種のベクター-pETDuet-1、pCDFDuet-1、pRSFDuet-1 に連結し、*E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS 株に導入した。これにより、それぞれの遺伝子を *大腸菌* 用の T7 プロモーター支配下で発現させることが可能となる。その結果、*mimG* との共発現により MimA タンパク質が可溶化し、*大腸菌* 細胞内においても活性型の MimABCD 複合体を再構成することができた(図3)。*大腸菌* 細胞内ではオキシゲナーゼスモールサブユニット MimC も不溶化する傾向にあったが、*mimG* との共発現で MimC タンパク質も可溶化した(図1参照)。また、*大腸菌* 細胞内においてはカップリングプロテイン MimD の発現量が著しく低かったが、*mimD* のコドンが *大腸菌* 用に最適化することにより発現量は改善され、フェノールのヒドロキノンへの変換活性も11倍に向上した(図3)。

本組換え *大腸菌* を利用して、MimABCD のアセトン代謝における機能を解析した。*mimABCD* および *mimG* を発現させた *大腸菌* とこれらの遺伝子を含まないベクターのみを導入した *大腸菌* をアセトンと反応させた。反応液を GC-MS 分析に供したところ、前者においてのみアセトールに相当するピークが検出された。これより、MimABCD はアセトンをアセトールに変換する活性を有していることが強く示唆された。

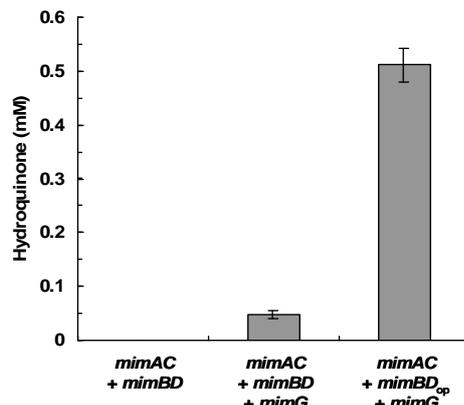


図3 *Mycobacterium* 属細菌由来二核鉄型酸化酵素の *大腸菌* 細胞内における活性発現  
縦軸はフェノール酸化生成物であるヒドロキノンの合成量、横軸は *大腸菌* に導入した遺伝子を示し、*mimBD<sub>op</sub>* の“op”は *mimD* のコドンを *大腸菌* 用に最適化したことを示す。

以上のように本研究では、*Mycobacterium* 属細菌由来二核鉄型酸化酵素の異種発現に成功し、その活性発現にオキシゲナーゼラージサブユニットに特異的なシャペロニンタンパク質が重要な役割を担っていることを明らかにした。放線菌に見られる二核鉄型酸化酵素遺伝子の近傍には当該シャペロニン遺伝子が一般に存在していることを確認しており、本研究における新規シャペロニンタンパク質の発見は、本ファミリー酸化酵素の異種発現や応用に大きなブレークスルーをもたらす可能性を秘めている。また、MimABCD発現大腸菌を利用することによりその生理機能に関する重要な知見を得られた。今後は、本研究で確立した異種発現技術を基盤として MimABCD 発現細胞のさらなる活性強化を図り、フェノールからのヒドロキノンの位置選択的合成を可能とする実用生体触媒の開発にも挑戦したい。

#### 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3件)

古屋俊樹、木野邦器、二核鉄型酸化酵素の異種発現と高選択酸化プロセスへの応用、バイオサイエンスとインダストリー、72、213-217 (2014).

T. Furuya, M. Hayashi, K. Kino, Reconstitution of active mycobacterial binuclear iron monooxygenase complex in *Escherichia coli*, 査読あり, Appl. Environ. Microbiol., 79, 6033-6039 (2013).

T. Furuya, M. Hayashi, H. Semba, K. Kino, The mycobacterial binuclear iron monooxygenases require a specific chaperonin-like protein for functional expression in a heterologous host, 査読あり, FEBS J., 280, 817-826 (2013).

[学会発表](計5件)

古屋俊樹、二核鉄酸化酵素を利用した高選択的酸化プロセスの開発、2013年度日本バイオインダストリー協会受賞者発表会、横浜、2013年10月9日。【2013年度化学・生物素材研究開発奨励賞受賞講演】

T. Furuya, K. Kino, Functional expression of the mycobacterial binuclear iron monooxygenases in a heterologous host, 11th International symposium on biocatalysis and biotransformations, Manchester, United Kingdom (Abstract p.101), July 21-25, 2013.

林未華、古屋俊樹、仙波尚、木野邦器、*Mycobacterium* 属細菌由来フェノールパラ位選択的酸化酵素遺伝子の異種発現、2012年度日本生物工学会大会(講演要旨集 p.48) 神戸、2012年10月23-26日。

林未華、古屋俊樹、仙波尚、木野邦器、*Mycobacterium* 属細菌が有する二核鉄型モ

ノオキシゲナーゼ遺伝子クラスターの異種発現に必要な因子の同定、第68回酵素工学会(講演要旨集 p.70) 東京、2012年10月15日。

古屋俊樹、*Mycobacterium* 属細菌が有するユニークな酸化酵素の機能解析と応用、第13回酵素応用シンポジウム(講演要旨集 p.4) 名古屋、2012年6月8日。【第13回酵素応用シンポジウム研究奨励賞受賞講演】

[その他]

ホームページ等

<http://www.waseda-oukakai.gr.jp/kaiinjouhou/kaiindousei/furuya.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

古屋 俊樹 (FURUYA, Toshiki)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：20367064

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし