

「バクテリアが産出する顆粒状構造体のバイオリクター利用のための基盤研究
バクテリアが産出する顆粒状構造体のバイオリクター利用のための基盤研究」

兵庫県立大学大学院生命科学研究科

柴田 直樹

1 研究の背景と目的

シアノバクテリアや腸内細菌は **Bacterial microcompartment (BMC)** と呼ばれるウイルスカプシド様の顆粒状構造体を使って、BMC 内に代謝酵素や中間体をその中に止めることにより、細菌にとって毒性を有する物質の代謝を円滑に進めることができる。例えば、エタノールアミンやプロパンジオールの代謝過程で発生する有毒なアルデヒドは、それぞれ *eut* オペロン、*pdu* オペロンの遺伝子発現によって作られる BMC 内で代謝される。BMC のそのような性質を利用すれば、抗菌剤などバクテリアにとって有害な物質でも、大腸菌において生合成できるシステムを構築できる可能性が高い。本研究では BMC の構成タンパク質の立体構造を基に改変することにより、BMC 内に低分子化合物を導入するための細孔の設計と、BMC 移行シグナル配列を BMC とは無関係のタンパク質・酵素に付加した場合に、BMC 内部にタンパク質・酵素が導入されるかどうか検討することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

2-① BMC 外殻を構築するタンパク質の改変による細孔の設計

eut オペロン上の遺伝子から、BMC 外殻の形成に必須である遺伝子 (*eutKLMNS*) のうち、*eutL* の遺伝子産物である EutL タンパク質三量体 (図 1) の中央にある細孔を形成するループ領域のアミノ酸残基について、野生型の立体構造を基に長さ(残基数)や種類を変えることにより、細孔のサイズを検討した。

2-② BMC 外殻を構築するタンパク質の立体構造解析

2-①で設計した改変 EutL の結晶化を行い、その X 線結晶構造解析を行った。X 線回折強度データの測定には SPring-8 のビームラインを利用した。構造解析は野生型 EutL の立体構造を用いた分子置換法によって行った。

2-③ 大腸菌発現系による BMC の調製および蛍光物質の取り込みと分析

eutKLMNS による BMC の大腸菌発現系は、*eutK*、*eutL*、*eutM*、*eutN* を pCDFDuet-1、*eutS* を pCOLADuet-1 に挿入したものを、大腸菌 BL21Gold(DE3)に導入し、構築した。なお、*eutK* と *eutL*、*eutM* と *eutN* はそれぞれ同じ mRNA 上に転写され、ポリシストロニック mRNA としてタンパク質を発現させた。また、2-①で設計した、細孔を形成するループ領域のアミノ酸残基を改変した *eutL* 変異体の遺伝子を野生型 *eutL* と入れ替えた発現系も構築した。BMC の調製は、作成した大腸菌発現系を用いて、以下のように行った。LB 培地で培養し、発現誘導した大腸菌を遠心分離によって集菌したものを、菌体ペレットを凍結せず、そのままタンパク質抽出用可溶化バッファー EzBactYeastCrusher (アトー株式会社) で懸濁し、BMC も含めたタンパク質を抽出した。次に大腸菌抽出液から中速遠心分離(9,500 × *g*)によって未破碎菌やデブリを除去した後、高速 (48,000 × *g*) で遠心分離することにより BMC を沈殿させた。得られた BMC ペレットを緩衝液で懸濁し、蛍光物質を混合し、4°C で 24 時間静置した。蛍光物質を添加した BMC 懸濁液について、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superose 6 increase (Cytiva)) によって分析を行った。

3 研究成果

3-① BMC 外殻を構築するタンパク質の改変による細孔の設計

野生型 EutL タンパク質三量体(図 1 左)の中央にある細孔は、主に Leu69–Glu83 および Pro179–Tyr185 で形成されるループ領域によって塞がれている。従って、これらループ領域を短くしたり、側鎖の体積が小さなアミノ酸に置換すれば細孔の大きさを拡張することが可能である。野生型 EutL の立体構造を検討した結果、Pro179–Tyr185、Leu69–Glu83 の領域について、ループ領域を短くし、側鎖の体積が小さなアミノ酸に置換すると細孔を拡張することが可能であると判断し、改変した変異体について、タンパク質試料の調製と結晶化を行った。

3-② BMC 外殻を構築するタンパク質の立体構造

3-①で設計した変異体のうち、Ser181–Asn184 を欠失させ、更に Pro180 および Tyr185 をいずれもグリシンに変異させた変異体 (EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)) について野生型 EutL と類似の結晶が得られた。この結晶について、SPRING-8 BL32XU において X 線回折強度データの測定を行い、2.0 Å のデータセットを取得した。構造解析は野生型 EutL の立体構造を用いた分子置換法によって行った。EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)は野生型 EutL と同様に三量体を形成し、その中央には細孔が存在していた(図 1 右)。変異を導入したループ領域 (G180 および G185) については電子密度が明確ではなかったためその部分については分子モデルを構築できなかった。当初の狙い通り、EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)三量体の細孔は三量体構造を維持しつつも野生型 EutL 三量体に比べて細孔が大きくなっていた(図 2)。Pro179–Tyr185 ループは野生型 EutL 三量体の細孔を塞いでい

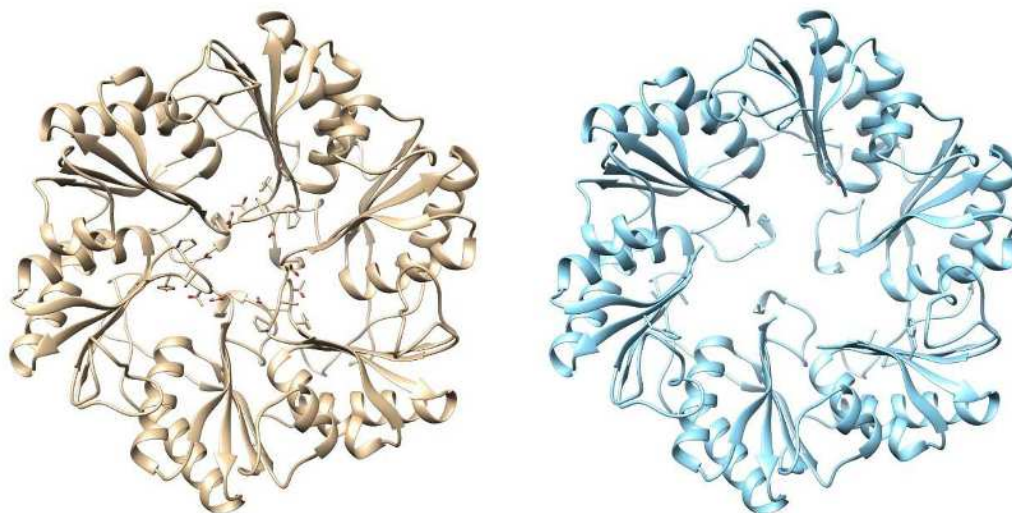


図1. 野生型 EutL および EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)三量体の全体構造

左: 野生型 EutL

右: EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)

細孔を形成するループ領域 (Leu69–Glu83 および Pro179–Tyr185) はスティックモデルで表示している。

るが、三量体の形成には直接かかわっていない。そのため、EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)でも野生型 EutL と同様に三量体構造を維持していると考えられる。一方、EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)においても、Leu69–Glu83 ループは三量体の形成に大きく寄与している可能性が高く、この部分を改変すると三量体構造が壊れてしまうことを示唆している。

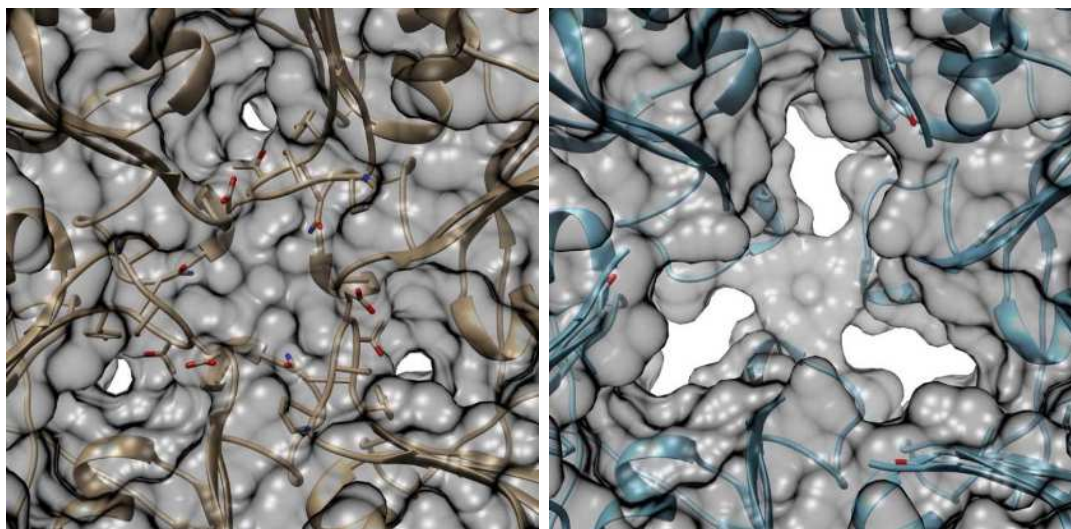


図2. 野生型 EutL および EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)三量体における細孔付近の立体構造および分子表面モデル

左:野生型 EutL

右:EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)

3-③ 大腸菌発現系による BMC の調製および蛍光物質の取り込みと分析

蛍光物質として、Dimethyl sulfoxide に溶解した Fluorescein を添加した BMC 懸濁液について、ゲルろ過クロマトグラフィーによって分析を行った。タンパク質による紫外線の吸収を 280 nm、Fluorescein による吸収を 494 nm でモニターした。BMC はウイルスと同程度のサイズがあるため、高分子量に対応可能な Superose 6 カラムでもほぼ排除体積付近に溶出される。用いたカラムでは 5 mL 付近に溶出されるが、280 nm のクロマトグラムから、野生型 EutL、EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)、いずれの場合も排除体積付近に BMC が溶出された。494 nm のクロマトグラムにおいても、280 nm のクロマトグラムの溶出ピークとほぼ同じ溶出体積にピークが現れた (図 3)。野生型 EutL に比べ、EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)の BMCの方が 494 nm のクロマトグラムにおけるピークが高い結果が得られた。これは、EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)の方が Fluorescein の BMC 内部への取り込みが効率的に進んだことを示している可能性があるが、タンパク質の吸収を示す 280 nm の溶出ピークの高さが低く、正確なピーク面積を見積もることができなかったため、494 nm/280 nm のピーク面積比を算出することができなかった。そのため、野生型 EutL と EutL(Δ 181–184/P180G/Y185G)の場合で BMC 内部への Fluorescein の取り込み効率を比較することができなかった。

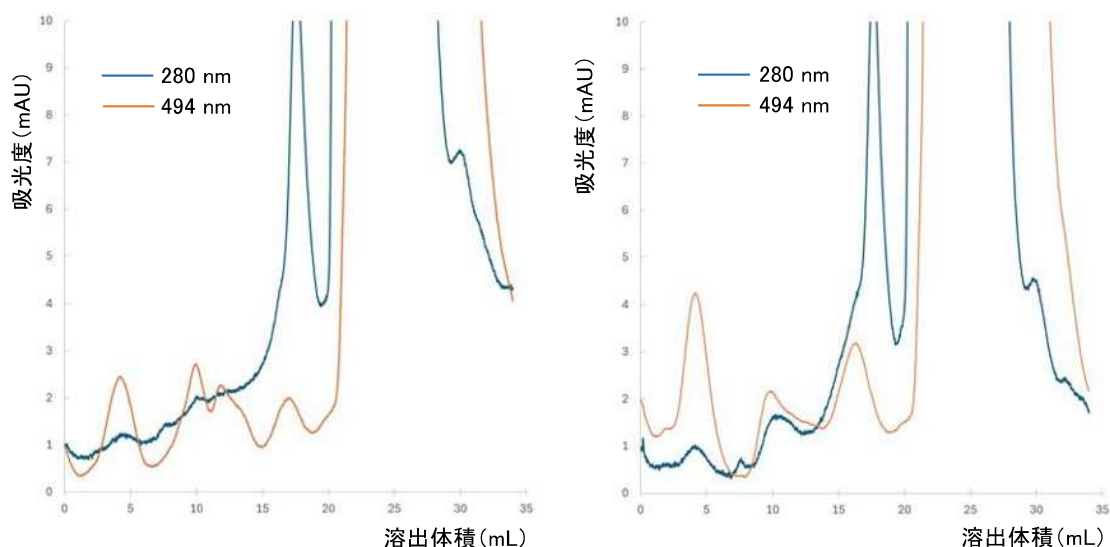


図3. 野生型 EutL および EutL($\Delta 18-184$ /P180G/Y185G) の Size exclusion chromatography

左: 野生型 EutL

右: EutL($\Delta 181-184$ /P180G/Y185G)

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により、EutL が構築する細孔は、それを形成するアミノ酸残基を大幅に改変しても細孔は維持されつつも、細孔のサイズを大きくすることが可能であることが示された。野生型 EutL から EutL($\Delta 181-184$ /P180G/Y185G)に入れ替えることによる BMC 内部への Fluorescein の取り込み効率の顕著な向上は確認できなかった。今回、EutL の Pro179-Tyr185 で形成されるループ領域に絞って改変したが、他の細孔を形成する領域を改変すれば、細孔のサイズをより大きくすることが可能となるため、EutL($\Delta 181-184$ /P180G/Y185G)を基に更に細孔周辺の改変を行い、BMC 内での物質生産が可能となるように、物質取り込み効率を向上することを目指す。

抗菌剤の開発は国内外を問わず、企業や公的研究機関において精力的に研究開発がなされているため競争が激しい分野であるが、研究の多様性が新しい抗菌薬開発に繋がる。抗菌剤の多用によって医療現場で耐性菌が増加する一方で、新しい抗菌薬の開発ペースは落ちてきていることが大きな社会的問題となっている。このような問題に対処するためには新しい視点から研究開発を進める必要がある。そのため本研究も含め、多様なアプローチによって新しい抗菌剤を開発することが急務である。現時点で本申請内容は萌芽的な研究であるが、中間生成物や最終生成物がバクテリアにとって有毒な物質であっても合成可能という特長を活かすことで、大腸菌発現系では合成困難な抗菌剤などのバイオ生産への道を切り拓くことができる。天然の抗生物質の6～7割は放線菌に由来し、抗生物質によっては放線菌によって生産されるが、大腸菌による異種発現によって製造コストを低減することが期待される。また、バイオリアクターとして抗生物質以外の有用物質の生産に応用できる可能性も秘めている。