

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	大腸菌におけるピリドキサル-5'-リン酸の恒常性における脱リン酸化酵素YbhAの役割
Title(English)	
著者(和文)	杉本良太
Author(English)	Ryota Sugimoto
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10588号, 授与年月日:2017年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 寛,和地 正明,田口 英樹,柘植 丈治,今村 壮輔
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10588号, Conferred date:2017/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 28 年度 博士論文

大腸菌におけるピリドキサル-5'-リン酸の恒常性における 脱リン酸化酵素 YbhA の役割

東京工業大学

総合理工学研究科 物質電子化学専攻

科学技術創成研究院

指導教員 田中 寛 教授

副指導教員 今村 壮輔准教授

杉本 良太

平成 29 年 5 月

目次

1.	序論	p5
1.1	細胞増殖および代謝	p5
1.2	本博士論文の構成	p6
	参考文献	

1 章

炭素源遷移時における中心代謝経路に存在する Isozyme の役割の解明

1.	解糖系および糖新生における各 Isozyme 欠損株および過剰発現株におけるグルコース-酢酸を炭素源とする最少培地を用いた増殖評価および遺伝子発現パターン解析	
1.1	序	p11
1.2	材料と方法	p13
	1.2.1 試薬類	p13
	1.2.2 使用菌株、プライマーおよびプラスミド	p13
	1.2.3 実験方法	p14
1.3	結果	p24
1.4	考察およびまとめ	p41
	参考文献	p45

2 章

大腸菌におけるピリドキサル-5'-リン酸の恒常性における脱リン酸化酵素 YbhA の役割

1.	序論	p52
1.1	Vitamin B ₆ (PLP: Pyridoxal-5'-phosphate) の特性および生理学的意義	p52
1.2	PLP 生合成経路および恒常性維持の重要性	p53

1.3 研究の目的	p54
1.4 参考文献	p58
2. PLP salvage pathway における PLP 前駆体 (PL: Pyridoxal, PM: Pyridoxamine, PN: Pyridoxine) 添加による増殖への影響評価	
2.1 序	p61
2.2 材料と方法	p63
2.2.1 試薬類	p63
2.2.2 使用菌株	p63
2.2.3 実験方法	p63
2.3 結果	p66
考察	p76
参考文献	p77
3. 大腸菌において PLP phosphatase 活性を示す YbhA、Cof、YigL の過剰発現および遺伝子欠損株を用いた PLP 蓄積の際の増殖評価によるスクリーニング	
3.1 序	p81
3.2 材料と方法	p83
3.2.1 試薬	p83
3.2.2 使用菌株およびプラスミド	p83
3.2.3 使用したプライマー	p85
3.2.4 実験方法	p90
3.3 結果	p93
3.4 考察	p105
参考文献	p107

4. PLP 蓄積・欠乏による代謝への影響	
4.1 序	p111
4.2 材料と方法	p114
4.2.1 試薬	p114
4.2.2 使用菌株	p114
4.2.3 使用したプライマー	p114
4.2.4 実験方法	p114
4.3 結果	p118
4.4 考察	p133
参考文献	p136
5. まとめ	p138
参考文献	p141
巻末	
本研究で使用した培地組成および緩衝液組成	
6. 謝辞	

1. 序論

1.1 細胞増殖および代謝

地球上に存在する細胞の普遍的特徴として、増殖および分裂が挙げられ、それらを支えるために代謝を行うことが挙げられる。代謝は、細胞外から取り込んだ有機化合物を核酸や種々のアミノ酸等の細胞の構成要素を生合成する同化反応、および、エネルギー化合物 ATP や還元力 NAD(P)H に代表される生化学反応の際に必要な小分子を生合成する異化反応に分類される。上述した細胞のシステムを解明するために、古くからモデル生物大腸菌を始めとした単純な微生物において生化学や遺伝学、分子生物学などの分野が発展し、細胞増殖や分裂機構の解明、そして代謝に関しては多様な代謝産物や酵素の同定が行われた。その結果、各々の代謝物は酵素が示す触媒活性により連鎖的に生合成され、さらにそれらがネットワーク状に相互に関連し合うことが明らかとなり、その全体像が描かれるまでに知見が蓄積した (図 1) (KEGG PATHWAY Database)。

細胞を取り巻く環境は変化する。これまでに行われてきた数多くの研究により、環境変化に応じてトランスポーターや代謝酵素をコードする遺伝子発現制御を行うことにより、エネルギー獲得や細胞の構成要素獲得の手段を最適化することが明らかにされてきた (Shimizu, 2013)。特に解糖系やペントースリン酸経路、TCA 回路から構成される中心代謝経路は全生物に保存された代謝経路であり、エネルギー化合物 ATP や NAD(P)H 獲得の主要代謝経路であるだけでなく、他の代謝経路、例えば種々のアミノ酸生合成経路などに基質を供給する機能を担う。従って、中心代謝経路は細胞を維持そして複製する上で、極めて重要な細胞システムであると考えられる。生命活動を支える基盤システムとしての理解が進む中で、環境変化に応じた中心代謝経路の制御機構に関して遺伝子発現パターンの解析、さらに ^{13}C を利用した carbon flux 解析により、環境依存的にどの代謝経路が利用されているか研究が行われた (図 2) (Gama-Castro et al., 2008; Haverkorn van Rijsewijk, et al., 2011)。上述のとおり、細胞は取り巻く状況に応じて代謝経路を切り替える

ことで、細胞システムを最適化し、自己保持や細胞増殖を達成している。すなわち細胞増殖と代謝は密接な共役関係にあると考えられる。しかし、環境変化時にどのような細胞システムが働くことで代謝経路の切り替えが行われ、細胞増殖の最適化が達成されているかには、未だ未解明な点が多く残されている。

1.2 本博士論文の構成

従って、細胞増殖と代謝を結びつける共役機構を解明することは、細胞を理解する上で極めて重要である。さらに、近年微細藻類や *Corynebacterium glutamicum* を始めとした細菌を資源ととらえ、これら微生物や微細藻類を利用することで biofuel やアミノ酸等の有用物質を生産させる研究が盛んに行われているが、微生物が示すこのような能力こそ代謝および細胞増殖に基づくものである。従って、細胞増殖と代謝の共役機構を解明することにより、人為的に細胞増殖および代謝活性が非常に強力な細菌を創出できるようになるだろう。従って、学術面だけでなく産業面においても細胞の普遍的特徴である細胞増殖と代謝間に存在する共役機構の解明は重要であると考えられる。

本研究では、上述の細胞増殖と代謝を介在する共役機構の解明を目的として、モデル生物大腸菌を用いて以下に示す 2 つの課題に取り組んだ。

- 炭素源遷移時における中心代謝経路に存在する Isozyme の役割の解明
- 大腸菌におけるピリドキサル-5'-リン酸の恒常性における脱リン酸化酵素 YbhA の役割

本博士論文では、以上 2 つの研究課題から得られた成果をまとめた。

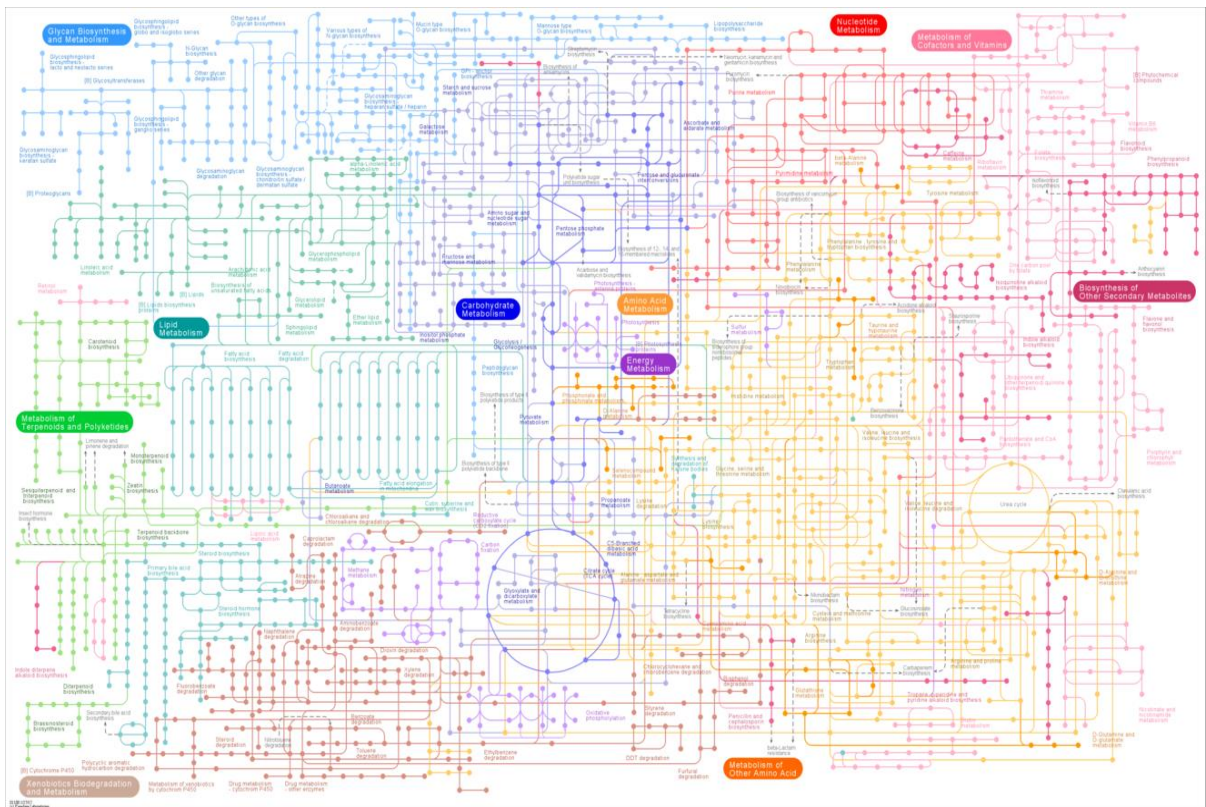
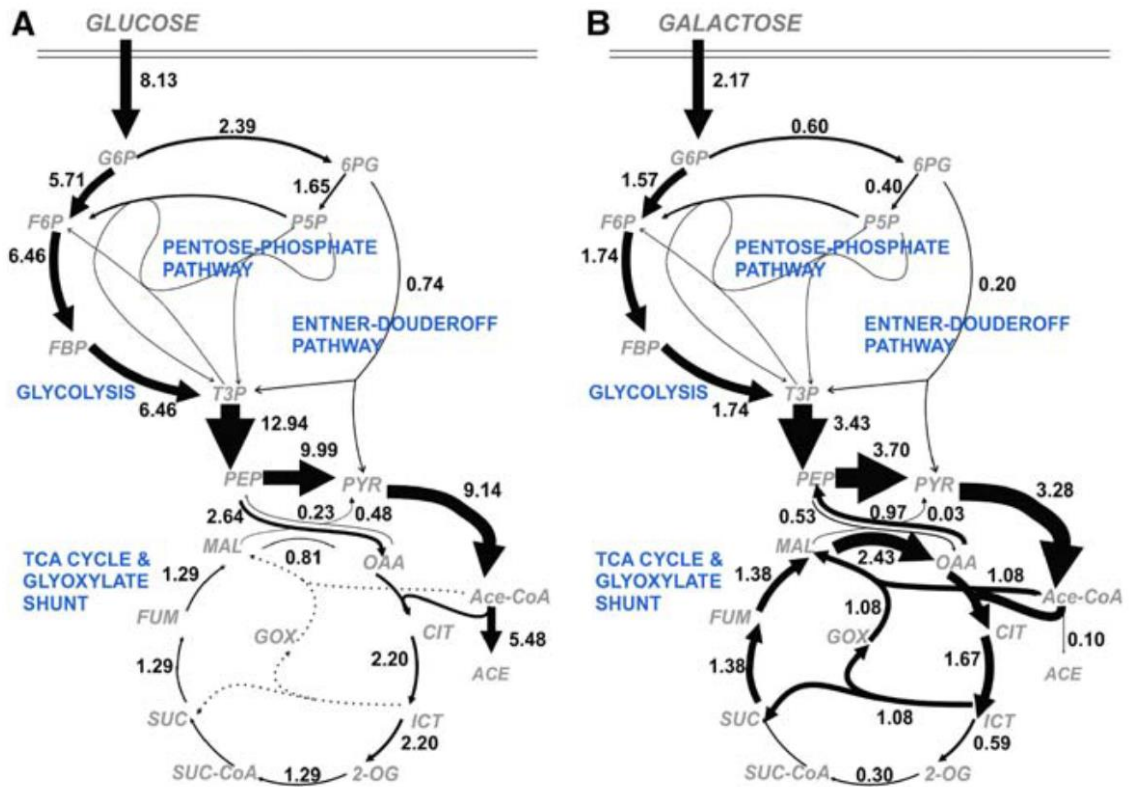


図 1 代謝経路概要図 (KEGG PATHWAY Database より引用)



(Haverkorn van Rijsewijk, et al., 2011)

図 2 炭素源に応じた代謝経路切り替え

好気条件下において大腸菌野生株 (BW25113 株) を、 ^{13}C でラベル化された (A) グルコースまたは (B) ガラクトースを炭素源とした M9 最少培地で培養した。矢印は carbon flux の向きを示しており、その太さは carbon flux 量を示している。数字は、carbon flux 量絶対値を示す。

参考文献

Gama-Castro, S., Jiménez-Jacinto, V., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Peñaloza-Spinola, M. I., Contreras-Moreira, B., Segura-Salazar, J., Muñiz-Rascado, L., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Bonavides-Martínez, C., Abreu-Goodger, C., Rodríguez-Penagos, C., Miranda-Ríos, J., Morett, E., Merino, E., Huerta, A. M., Treviño-Quintanilla, L., & Collado-Vides, J. (2008). RegulonDB (version 6.0): Gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 120–124.

Haverkorn van Rijsewijk, B. R. B., Nanchen, A., Nallet, S., Kleijn, R. J., and Sauer, U. (2011). Large-scale ¹³C-flux analysis reveals distinct transcriptional control of respiratory and fermentative metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 1–12.

Shimizu, K. (2013). Metabolic Regulation of a Bacterial Cell System with Emphasis on *Escherichia coli* Metabolism. *ISRN Biochem.*, 1–47.

1 章

炭素源遷移時における中心代謝経路に存在する Isozyme の役割の解明

1. 解糖系および糖新生における各 Isozyme 欠損株および過剰発現株におけるグルコース-酢酸を炭素源とする最少培地を用いた増殖評価

1.1 序

上述のとおり、解糖系は glucose-6-phosphate を始発物質として pyruvate にまで段階的に酸化する代謝経路であり、その過程においてエネルギー化合物 ATP を得る。さらに carbon flux をペントースリン酸経路へ供給し、NADPH および DNA や RNA の骨格となる ribose-5-phosphate などに代表される pentose-5-phosphate を生合成するなど、細胞システムを支える上で極めて重要な代謝経路である (Fraenkel, 1987)。従って、環境変化が生じた際に細胞が生き残るには、代謝経路を適切に調節することで、その環境に順応しなければならない。そのための主要な細胞応答はこれまでに遺伝子発現制御によるものであると考えられてきた (Gama-Castro et al., 2008)。しかし近年、合成生物学の発達に伴いその観点は見直されつつあり、細胞システムが調節される際、遺伝子発現制御を含めどのような過程を経て環境変化に応じた最適化が達成されるか包括的な細胞システムの理解に焦点が集まるようになった (Heinemann and Sauer, 2010)。

解糖系を介在する不可逆反応過程は、Isozyme と呼ばれる酵素としての活性はほぼ同様でありながら、アミノ酸配列において相同性を示さないタンパク質分子としては別種とみなされる複数の酵素により触媒される。このような不可逆反応過程は、carbon flux 量を制御する重要な過程として考えられており、大腸菌やコリネバクテリウム等の微生物を利用した効率的な有益物質生産のための遺伝子欠損または過剰発現の対象となっている (Becker et al., 2005; Park et al., 2007; Sundara et al., 2016)。しかしながら、細胞内環境変化に応じた Isozyme の生理的役割は未解明問題であり、この問題を明らかにすることで学術的・産業的に重要な知見となると考えられる。

本研究室において、炭素源遷移時における炭素代謝状態を観察できる実験系を開発している (Shimada and Tanaka, 2016)。そこで、本章では解糖系における不可逆反応

を触媒する各 Isozyme 遺伝子に着目した (図 3)。そして、それら遺伝子の欠損株および過剰発現株の増殖曲線をその実験系上で測定することで、炭素源遷移時における個々の Isozyme の生理機能を明らかにすることを目的とした。

1.2 材料と方法

1.2.1 試薬類

本研究で使用した試薬類を本節で記すこととする。

純度 99.0% 以上試薬特級 NaHPO₄、NH₄Cl、NaCl、D-Glucose、CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O および試薬一級 KH₂PO₄ は和光純薬化学工業株式会社製を用いた。純度 98.0% 以上 IPTG (isoproryl-β-D-thiogalactopyranoside) はナカライテスク株式会社製を用いた。casamino acids として、ハイカザミノ酸「ダイゴ」(製造: 日本製薬株式会社) は和光純薬工業株式会社製を用いた。

1.2.2 使用菌株、プライマーおよびプラスミド

表 2.1 に本節で使用した大腸菌株を示す。表 2.2 にプライマーおよびプラスミドを示す。KO コレクション (Baba et al., 2006) より取得した各遺伝子欠損株は、表 2.2 中プライマーおよび Gotaq Green Master Mix (Promega) を用いたコロニー PCR 法にて、目的遺伝子の欠損を確認した。

表 2.1 に示す多重欠損株 (Δpfk 、 Δpyk 、 $\Delta 3-glpX^+$) は、P1 ファージを利用した形質導入、および、pCP20 プラスミドから発現する組み換え酵素 FLP による FRT サイト間での相同組み換えを利用することで作成した。 Δpfk 株を例に作成手順を本節で述べる(図 4)。pCP20 プラスミドで形質転換した 30 μg mL⁻¹ kanamycin を添加した 3 mL LB 培地に $\Delta pfkA$ ($pfkA::Km^R$) 株を白金耳で植菌し、30°C、165 rpm の速度で 16-18 時間培養し、前培養液を得た。その前培養液 60 μL を、新しい 3 mL LB 培地へと植菌し 42°C、125 rpm の速度で 3-4 時間振とう培養した。本培養液を LB 寒天培地へと播種、37°C、16-18 時間静置培養することで、 $pfkA::null$ 変異候補株を得た。その際、ampicillin および kanamycin に対し、感受性を示すか寒天培地上で選択を行い、両抗生物質に感受性を示した株を、表 2.2 に示す $pfkA_F/R$ プライマーセットおよび Kan_F/R プライマーセットを用いてコロニー PCR し、 $pfkA::null$ 変異株であることの確認を行った。次に、予め $\Delta pfkB$

(*pfkB::Km^R*) 株に感染させることで得た P1 phage lysate を用いて *pfkA::null* 株に形質導入した。*Δpfk* 候補株の選択は 30 μg mL⁻¹ kanamycin を添加した LB 寒天培地上で選択を行った。*pfkB_F/R* プライマーセットおよび *Kan_F/R* プライマーを利用したコロニーPCRにて、*pfkA::null pfbB::Km^R* であると確認できた株を、*Δpfk* 株として本実験にて利用した。

各 Isozyme 遺伝子プロモーター活性を測定するため phosphofructokinase *pfkA* および *pfkB*、pyruvate kinase *pykF* および *pykA*、fructose-1,6-bisphosphatase *fbp*、*glpX*、*yggF*、*ybhA* 遺伝子上流の各プロモーター活性を測定するため、それぞれの ORF (Open Reading Frame) から上流 500 bp の領域を PCR 法により増幅し、得られた DNA 断片を *lacZ* 遺伝子をコードする pRS551 プラスミド (Simons et al., 1987) 上の EcoR1-BamH1 サイト間にクローニングした (表 2.3)。このとき、使用したプライマーはセットは”prs_遺伝子名 p_F/R” を用いた。なお、pRS551-*pykA*、pRS551-*fbp*、pRS551-*glpX*、pRS551-*yggF*、pRS551-*ybhA* に関しては、当研究室島田友裕博士より分与して頂いた。

1.2.3 実験方法

培養条件

Luria-Broth 寒天培地 (Bertani, 1951) にグリセロールストックの状態にある各大腸菌株を画線培養し、30°C に一晚置き静置培養を行い、コロニーを得た (KO collection (Baba et al., 2006) 由来の遺伝子欠損株の培養には 30 μg mL⁻¹ kanamycin、ASKA library (Kitagawa et al., 2005) から取得した pCA24N Δ *gfp* vector を保持する株の培養には 20 μg mL⁻¹ chloramphenicol を添加)。グルコースを炭素源とした 0.2% casamino acids 含有 M9 最少寒天培地へと白金耳にてシングルコロニーを採取、画線培養し、30°C、一晚静置培養した。前培養液は、M9 最少寒天培地上に得た大腸菌野生株シングルコロニーを、3 mL の 0.2% グルコースを炭素源とする 0.2% casamino acids 含有 M9 最少培地へと白金耳を用いて植菌し、150 rpm、30°C、24 時間振とう培養することで得た。本培養は、0.02% グルコース および 0.02% 酢酸を共炭素源とし、0.2% casamino acids を添加

した 5 mL M9 培地に 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌した後、150 rpm、30°C にて震とうすることで行った。増殖測定は、30 分毎に $\lambda = 600 \text{ nm}$ における濁度 (OD_{600}) を OD-Monitor C & T instrument (TAITEC) を使用して測定した。本培養条件では、 $\text{OD}_{600} = 0.4$ においてグルコース欠乏となることが当研究室で行われた既往研究から明らかにされており、実際、グルコース要求性株である *Afbp* 遺伝子欠損株においては培地中のグルコース欠乏後に増殖できないことが本実験系において確認されている (Shimada and Tanaka, 2016)。pCA24N*A**gfp* vector 上からの遺伝子発現には、本培養時に 500 μM IPTG を添加した。

***Vibrio fischeri* 由来 Luciferase 活性測定**

大腸菌野生株 (BW25113 株) に、pLXUV5 プラスミド (Koga et al., 2005) を形質転換し、50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin 含有 LB 寒天培地 (以下、LB+Amp 寒天培地) 上で形質転換体を培養した。同寒天培地上で得られた各形質転換体シングルコロニーを、さらに、0.2% グルコース を炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 + Amp 最少寒天培地に白金耳を用いて画線し、30°C、24 時間培養した。前培養液は、上記 M9 最少寒天培地上に生えた各形質転換体シングルコロニーを 0.2% グルコースを炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 + Amp 最少培地 3 mL に植菌し、30°C、150 rpm で振とう培養して調整した。本培養は、T 字型試験管 においてグルコース制限条件 (0.002% グルコース、0.2% casamino acids) (Shimada and Tanaka, 2016) M9 最少培地 15 mL を加え、そこに 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌し、30°C、25 rpm で振とう培養し行った。30 分間隔で OD_{600} を SPECTRONIC (MILTON ROY) で測定し、本培養液 100 μL を回収した。ルミノメーター LUMAT LB9507 (EG & G BERTHOLD) の Raw data measurement mode を用いて回収した培養液を経時的に測定した。この場合、フォトマルチプライヤでカウントされた光子の数 10 フォトン を 1 RLU に換算した。測定時間は 10

秒間とした。Luciferase 活性の単位としては、RLU を培養液の濁度で割った値 (RLU/OD₆₀₀) を用いた。

LacZ タンパク質を利用した各 Isozyme 遺伝子プロモーター活性測定

大腸菌野生株 (BW25113 株) に、各 pRS551-*pfkA*、pRS551-*pfkB*、pRS551-*pykF*、pRS551-*pykA*、pRS551-*fbp*、pRS551-*glpX*、pRS551-*yggF*、pRS551-*ybhA* プラスミドを形質転換し、LB + Amp 寒天培地上で形質転換体を培養した。同寒天培地上で得られた各形質転換体シングルコロニーを、さらに、0.2% グルコースを炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 + Amp 最少寒天培地に白金耳を用いて画線し、30°C、24 時間培養した。前培養液は、上記 M9 最少寒天培地上に生えた各形質転換体シングルコロニーを 0.2% グルコース を炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 + Amp 最少培地 3 mL に植菌し、30°C、150 rpm で振とう培養して調整した。本培養は、T 字型試験管 においてグルコース 制限条件 (0.002% グルコース、0.2% casamino acids) (Shimada and Tanaka, 2016) M9 最少培地 15 mL を加え、そこに 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌し、30°C、25 rpm で振とう培養し行った。各代謝状態 (1. グルコース を炭素源とした解糖系利用時期、2. 炭素源遷移、3. 酢酸を炭素源とする TCA cycle または糖新生利用時期、4. 酢酸枯渇後のアミノ酸の異化) (図 5) において OD₆₀₀ を SPECTRONIC (MILTON ROY) で測定し、本培養液 100 μL を回収した。回収した培養液は 900 μL Z buffer、50 μL chloroform および 50 μL 0.02% SDS からなる混合液と合わせ、15 秒間激しく vortex した後、2-3 分間 28°C で静置した。そこへ、4 mg mL⁻¹ ONPG を 200 μL 添加し、4-5 回転倒混和し、反応時間の測定を開始した。ある程度、同反応液が黄色に変化したところで 1 M Na₂CO₃ 450 μL を添加し、反応を停止、時間測定を終了し、反応時間 t [sec] を求めた。7000 rpm、3 分間室温にて反応液を遠心し、その上清を用いて波長 420 nm における光学密度 (OD₄₂₀) を MULTI PLATE READER

MODEL 680 (TAITEC) を用いて測定した。 β -galactosidase activity は式 ① に従い算出した。

$$\beta - \text{galactosidase activity [Miller unit]} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{\text{OD}_{600} \times t} \quad \text{①}$$

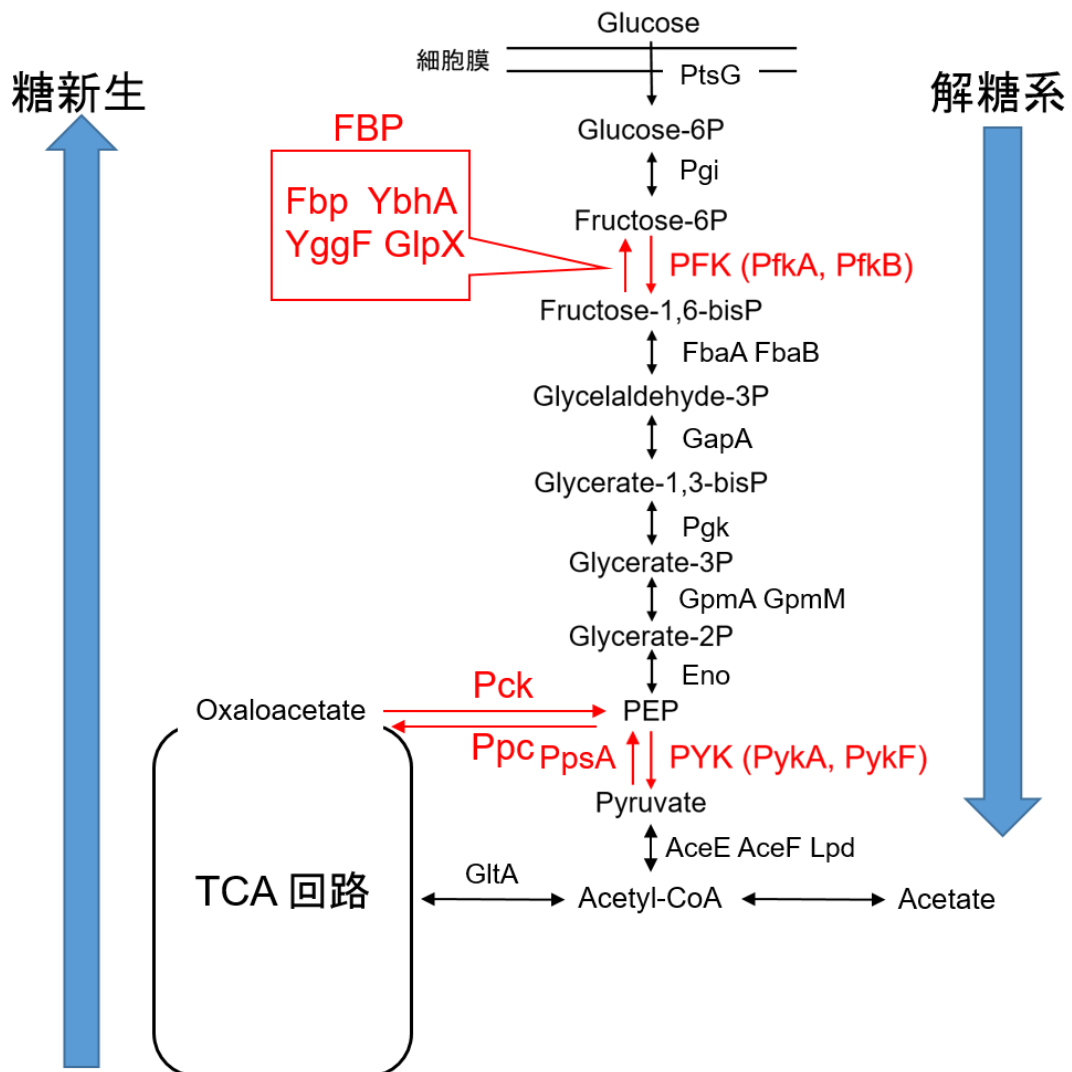


図 3 大腸菌における解糖系、糖新生経路概略図

赤字は、解糖系および糖新生における不可逆過程、および、その反応を触媒する酵素名を示す。

略称: PFK; Phosphofructo kinase、PYK; Pyruvate kinase、FBP; Fructose-1,6-bisphosphatase

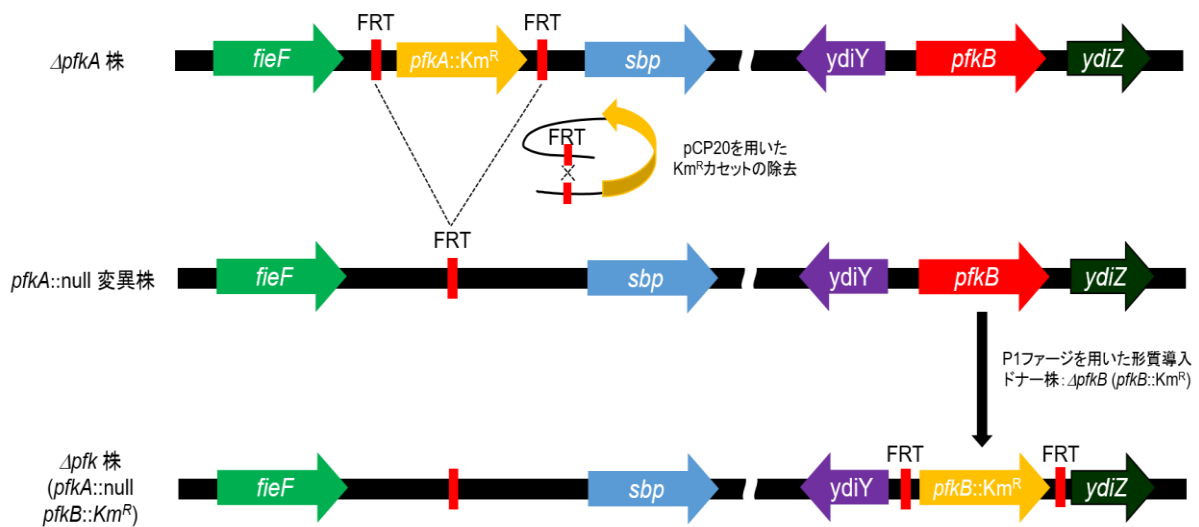
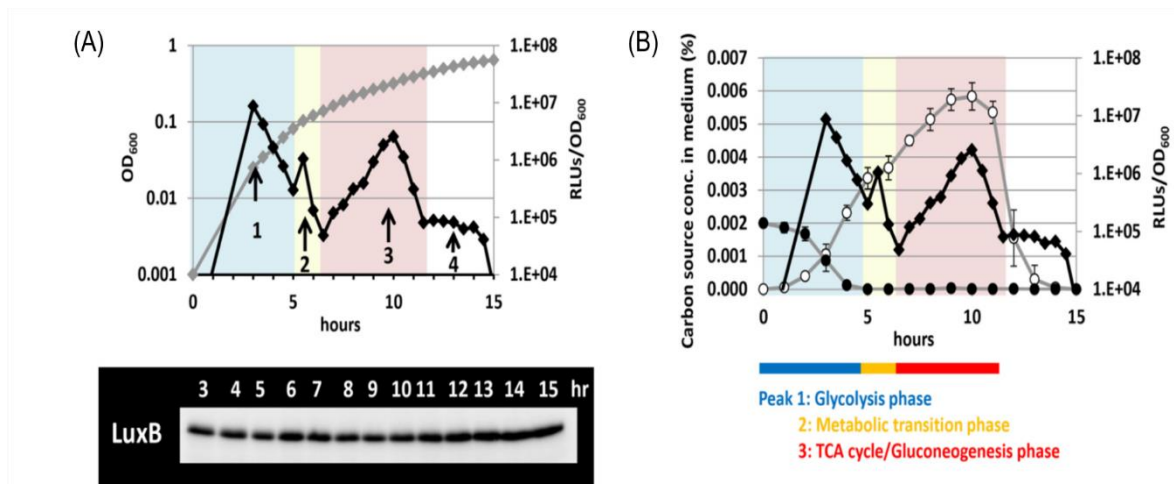


図 4 Isozyme 遺伝子多重欠損株作成手順の概要

$\Delta pfkA$ 株は *pfkA* 遺伝子座に Kanamycin 耐性遺伝子 (Km^R) が置換される形式で欠損株となっている。本株は、Kanamycin 耐性遺伝子の上流および下流に FLP recognition target (FRT) 領域が配置されている (Baba et al., 2006)。*pfkA::null* 変異株を得るために、 $\Delta pfkA$ 株に pCP20 プラスミドを形質転換し、本プラスミド上から FLP 組み換え酵素を発現させることで FRT 領域の相同組み換えを行い Kanamycin 耐性遺伝子の欠失を行った。さらに、得られた *pfkA::null* 変異株を宿主株とし、 $\Delta pfkB$ 株に感染させた P1 ファージを用いて形質導入を行い、phosphofructokinase 多重欠損株 Δpfk (*pfkA::null*, *pfkB::Km^R*) を得た。



(Shimada and Tanaka, 2016) より引用、改変

図 5 *Vibrio fischeri* 由来 Luciferase を利用した炭素源代謝状態の推定系

pLXUV5 プラスミド (Koga et al., 2005) で形質転換された大腸菌野生株 (BW25113 株) は、0.002% グルコースを炭素源とする M9 最少培地で培養された。(A) グルコース制限条件下における(上)増殖曲線(灰色線)、Luciferase 活性(黒線)および (下) LuxB 発現量。(B) ルシフェラーゼ活性 (黒線)、培養液中 グルコース濃度 (灰色線および黒マーカー)、酢酸濃度(灰色線および白マーカー)。グルコース制限下において Luciferase 活性にみられる 4 つの特徴的なピークがそれぞれ、1: 解糖系利用時、2: 代謝状態遷移時、3: TCA 回路または糖新生経路利用時であることが報告された。また、4 つ目のピークは、酢酸欠乏後アミノ酸異化代謝状態に相当することが示唆された (Shimada and Tanaka, 2016)。

表 2.1 本節で使用した大腸菌株

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	Source
BW25113	W3110 <i>lacI^a rrnBT14 ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78</i>	国立遺伝学研究所
<i>ΔpfkA</i>	BW25113 <i>pfkA::Km^R</i>	KO collection*
<i>ΔpfkB</i>	BW25113 <i>pfkB::Km^R</i>	KO collection
<i>ΔpykF</i>	BW25113 <i>pykF::Km^R</i>	KO collection
<i>ΔpykA</i>	BW25113 <i>pykA::Km^R</i>	KO collection
<i>Δfbp</i>	BW25113 <i>fbp::Km^R</i>	KO collection
<i>ΔglpX</i>	BW25113 <i>glpX::Km^R</i>	KO collection
<i>ΔyggF</i>	BW25113 <i>yggF::Km^R</i>	KO collection
<i>ΔybhA</i>	BW25113 <i>ybhA::Km^R</i>	KO collection
<i>Δpfk</i>	BW25113 <i>pfkA::null pfkB::Km^R</i>	This study
<i>Δpyk</i>	BW25113 <i>pykF::null pykA::Km^R</i>	Gifted from Dr. Shimada, T.
<i>Δ3-glpX⁺</i>	BW25113 <i>ybhA::null yggF::null fbp::Km^R</i>	This study

* KO collection (Baba et al., 2006)

表 2.2 本節で使用したプライマー

Primer Name	Sequence (5' to 3')
<i>pfkA_F</i>	GCATTCCAAAGTTCAGAGGTA
<i>pfkA_R</i>	AAGGAATCTGCCTTTTTCCGA
<i>pfkB_F</i>	GCCAGACTGAAATCAGCCTA
<i>pfkB_R</i>	ACATTGGGGTGATGATTCCC
<i>fbp_F</i>	GTTAAGATTGTTGCGGTCGC
<i>fbp_R</i>	GCGCAGCAATAAAAACGCCT
<i>glpX_F</i>	CAACCCCGCACACATCAATA
<i>glpX_R</i>	GAAGGCTCAATCGATCAAATC
<i>yggF_F</i>	ATTTGGCGTTGATATCGGGG
<i>yggF_R</i>	GGTCTTCCGATAGATCACCA

ybhA_F	GTGGTATCGGTGTACCATTC
ybhA_R	AAGTGTGTCGATAACCGCCT
Kan_F	GGCTATGACTGGGCACAACA
Kan_R	GGCGATACCGTAGAGCACG
prs_pfkAp_F	CCGGAATTCGGCGCAATTCTGCTGGCG
prs_pfkAp_R	CGCGGATCCTCCAACGAATGTGCAAATAGT
prs_pfkBp_F	CCGGAATTCCGCCC GCCGCATATTTTC
prs_pfkBp_R	CGCGGATCCCATTTCCTCCTATAGGCTGAT
prs_pykFp_F	CCGGAATTCCACATTTCTCGGTACAGTTCA
prs_pykFp_R	CGCGGATCCGACAGTCTTAGTCTTTAAGTTG

表 2.3 本節で使用したプラスミド

Plasmid	Source
pCP20	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pCA24N Δ <i>gfp</i>	ASKA library**
pCA24N Δ <i>gfp-pfkA</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-pfkB</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-pykF</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-pykA</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-fbp</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-glpX</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-yggF</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-ybhA</i>	ASKA library
pLXUV5	(Koga et al., 2005)
pRS551- <i>pfkA</i>	This study
pRS551- <i>pfkB</i>	This study
pRS551- <i>pykF</i>	This study
pRS551- <i>pykA</i>	Gifted from Dr. Shimada, T.
pRS551- <i>fbp</i>	Gifted from Dr. Shimada, T.

pRS551-*glpX* Gifted from Dr. Shimada, T.

pRS551-*yggF* Gifted from Dr. Shimada, T.

pRS551-*ybhA* Gifted from Dr. Shimada, T.

** ASKA library (Kitagawa et al., 2005)

1.3 結果

1.3.1 解糖系を介在する各 Isozyme 遺伝子欠損株の増殖曲線測定

まず各 Isozyme の炭素源遷移時における役割を検証するため、0.02% グルコース、および、0.02% 酢酸を炭素源とする M9 最少培養液 において各 Isozyme 遺伝子欠損株の増殖曲線を測定した (図 6)。炭素代謝の過程において、解糖系を流れる carbon flux の一部はアミノ酸生合成へと利用されるため、エネルギー獲得の際の Isozyme 遺伝子欠損の影響を観察することは困難となる。そこで本実験では、0.2% casamino acids を同 M9 最少培地に添加することで、エネルギー獲得に利用される carbon flux を観察するための実験系を構築した。

① Phosphofructokinase 単一遺伝子欠損株 ($\Delta pfkA$ 、 $\Delta pfkB$ 株) における増殖曲線測定結果

phosphofructokinase 遺伝子をコードする *pfkA* および *pfkB* 遺伝子各々の欠損株 ($\Delta pfkA$ 、 $\Delta pfkB$) においては、 $\Delta pfkA$ 株で著しい増殖速度の低下が観察された一方、 $\Delta pfkB$ 株では野生株と比較して遺伝子欠損による影響が観察されなかった (図 6 (A))。また、それぞれの遺伝子欠損株において、グルコース欠乏後、酢酸を炭素源として利用する増殖相 ($OD_{600} = 0.4$ 以降) に関しても、顕著な表現型は得られなかった。

② pyruvate kinase 単一遺伝子欠損株 ($\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$ 株) における増殖曲線測定結果

pyruvate kinase 遺伝子をコードする *pykA* および *pykF* 遺伝子各々の欠損株 ($\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$) の増殖曲線を測定した結果、それぞれの欠損株でグルコース利用時の増殖速度は野生株と比較して違いはなかった。その一方でグルコース欠乏後、酢酸を炭素源として利用する増殖相 ($OD_{600} = 0.4$ 以降) においては、それぞれの欠損株において増

殖速度の低下が観察された。このとき、 $\Delta pykF$ 欠損株においては $\Delta pykA$ 株と比較すると増殖速度の低下が大きかった (図 6 (B))。

③ fructose-1,6-bisphosphatase 単一遺伝子欠損株 (Δfbp 、 $\Delta glpX$ 、 $\Delta yggF$ 、 $\Delta ybhA$ 株) における増殖曲線測定

fructose-1,6-bisphosphatase の各々の遺伝子欠損株 (Δfbp 、 $\Delta ybhA$ 、 $\Delta glpX$ 、 $\Delta yggF$ 株) では、グルコース利用時の増殖相においては野生株と比較して遺伝子欠損による影響は全く観察されなかった (図 6 (C))。その一方、グルコース欠乏後に酢酸を炭素源として利用する増殖相 ($OD_{600} = 0.4$ 以降) に遷移した際、 Δfbp 株は増殖停止が観察された。 $\Delta glpX$ および $\Delta yggF$ 株においては、グルコースから酢酸へ利用炭素源が遷移する際に増殖阻害が生じ、増殖速度の低下が観察された。 $\Delta ybhA$ 株においては、野生株と比較して遺伝子欠損による影響が全く生じなかった (図 6 (C))。

これらの結果から、fructose-6-phosphate を fructose-1,6-bisphosphate へとリン酸化する際は PfkA が主要なリン酸化酵素であることが示唆された。

PEP (phosphoenolpyruvate) を pyruvate へと変換する際には、PykF が主要なリン酸化酵素であり、グルコース欠乏後、酢酸を炭素源として利用する際に必要となる糖新生においても生理的に重要な役割を果たすことが示唆された。

糖新生の一過程である fructose-1,6-bisphosphate を fructose-6-phosphate へと脱リン酸化する際は、Fbp が主に使用される酵素であり、GlpX および YggF は Fbp と比較して活性が低いことが示唆された。その一方で、YbhA は糖新生においては機能しないことが示唆された。

1.3.2 各 Isozyme 遺伝子プロモーター活性測定

前節で、Isozyme 遺伝子欠損株の増殖を測定した結果、代謝経路での触媒反応は同様であるにも関わらず、個々の Isozyme 遺伝子欠損株間で増殖速度に違いが出た。この結果から炭素源遷移時における Isozyme の生理的役割の違いがあることが示唆された。そこで、個々の Isozyme の生理的役割の違いが遺伝子発現量に基づくものか検証を行った。当研究室における *Vibrio fischeri* 由来 Luciferase を利用した既往研究 (Shimada and Tanaka, 2016) で明らかにされた各代謝状態 (図 5 および図 7 (A) に示す Luciferase 活性測定で観察された各ピーク (1-4))

1. グルコースを炭素源とした解糖系利用時期
2. 炭素源遷移
3. 酢酸を炭素源とする TCA cycle または糖新生利用時期
4. 酢酸枯渇後のアミノ酸の異化期

において、0.02% グルコース、および、0.02% 酢酸を炭素源とする M9 最少培養液から各 pRS551 プラスミド (表 2.3) を保持する大腸菌野生株を回収し、 β -galactosidase 活性の測定を行った (図 7 (B)-(D))。

① phosphofructokinase *pfkA* および *pfkB* 遺伝子プロモーター活性測定結果

主に解糖系を利用しグルコースを異化する過程 (図 7 (B) 1) において、phosphofructokinase *pfkA* のプロモーター活性が *pfkB* と比べ 1.5 倍程度強く有意差は得られなかった。さらに、グルコースから酢酸へと利用炭素源が遷移する際においては、*pfkA* および *pfkB* 遺伝子プロモーター活性に差は見られず、恒常的にプロモーター活性が維持されていた (図 7 (B) 2-4)。この結果から、*pfkA* および *pfkB* においては量的な活性制御は存在しないことが示唆された。

② pyruvate kinase *pykA* および *pykF* 遺伝子プロモーター活性測定結果

pyruvate kinase *pykA* および *pykF* 遺伝子のプロモーター活性を測定した結果、*pykF* 遺伝子プロモーター活性が解糖系利用時において *pykA* 遺伝子と比較して約 2 倍プロモーター活性が高く (図 7 (C) 1)、グルコース枯渇後、酢酸を炭素源と利用する代謝状態では差が見られなかった (図 7 (C) 2-4)。この結果から、PykA と比較して PykF が解糖系利用時に主に発現され、phosphoenolpyruvate から pyruvate への変換に寄与することが示唆された。

③ fructose-1,6-bisphosphatase *fbp*、*glpX*、*yggF* および *ybhA* 遺伝子プロモーター活性測定結果

fructose-1,6-bisphosphatase をコードする各 Isozyme 遺伝子プロモーター活性を測定した結果、解糖系利用時において *fbp* 遺伝子のプロモーター活性は、*pfkA* や *pykF* 遺伝子プロモーターと同程度あり、その一方で *glpX* および *yggF* 遺伝子プロモーター活性は *fbp* と比較し約 2 倍低かった。また、*ybhA* 遺伝子のプロモーター活性は *fbp* 遺伝子と比べ、4 分 1 程度であり著しく低かった (図 7 (D) 1)。グルコース枯渇後、酢酸を利用して TCA 回路および糖新生を主に利用する代謝状態に遷移した際、*fbp*、*glpX* および *yggF* 遺伝子のプロモーター活性は同程度であることが分かり、*ybhA* 遺伝子に関しては、変化が見られなかった (図 7 (D) 2-4)。これらの結果から、TCA 回路や糖新生を利用する代謝状態においては、*fbp* だけでなく *glpX* および *yggF* 遺伝子の発現が促され、それぞれの酵素が糖新生を触媒することで、グルコース欠乏後、酢酸を炭素源として利用する代謝状態へと最適化していることが示唆された。さらに、解糖系から TCA 回路および糖新生へと代謝状態が遷移する際に、*ybhA* 遺伝子のプロモーター活性に変化が見られず恒常的に低かったことから、*ybhA* 遺伝子の発現は炭素源遷移時においては制御されないことが示唆された。

1.3.3 解糖系を介在する各 Isozyme 遺伝子過剰発現株の増殖曲線測定

前節で、Isozyme 遺伝子欠損株の増殖を測定した結果、代謝経路での触媒反応は同様であるにも関わらず、個々の Isozyme 遺伝子欠損株間で増殖速度に違いが生じた (図 6)。さらに、グルコースから酢酸へと炭素源が遷移する際の各 Isozyme 遺伝子のプロモーター活性を測定したところ、pyruvate kinase (*pykA*、*pykF*) 遺伝子および *ybhA* 遺伝子を除く fructose-1,6-bisphosphatase (*fbp*、*glpX*、*yggF*) 遺伝子のプロモーター活性が異なることから遺伝子発現量に依存した酵素活性の調節により、代謝の最適化が行われていることが示唆された (図 7)。そこで、各代謝反応を触媒する Isozyme 毎に多重欠損株を作成し (表 2.1)、個々の Isozyme を過剰発現させることで、対となる Isozyme の機能を相補できるか、また 真に Isozyme の機能は量的に制御されるものか検証を行った。

① phosphofructokinase 多重欠損株を用いた *pfkA* および *pfkB* 遺伝子相補実験

phosphofructokinase をコードする *pfkA* および *pfkB* 遺伝子を欠損した Δpfk 株は 0.02% グルコース、および、酢酸を炭素源とし、アミノ酸源として加えた 0.2% casamino acids を添加した M9 最少培養液においては増殖できなかった (図 8 (A) および (B))。しかし、pCA24N Δgfp -*pfkA* プラスミドを Δpfk 株へ形質転換した形質転換体の増殖を測定した結果、IPTG を添加せず *pfkA* 遺伝子の過剰発現を誘導しなかったにも関わらず、増殖が *pfkA* 遺伝子過剰発現と同程度まで回復した。これらの株は、酢酸を炭素源として利用する増殖状態 ($OD_{600}=0.1$ 以降) においても同様に増殖した (図 8 (A))。

pCA24N Δgfp -*pfkB* プラスミドで形質転換した Δpfk 株においては、*pfkB* 遺伝子過剰発現により増殖が回復した (図 8 (B))。従って、PfkB を過剰発現させることで PfkA を相補することが可能であることが示唆された。

② pyruvate kinase 多重欠損株を用いた *pykA* および *pykF* 遺伝子相補実験

pyruvate kinase 遺伝子多重欠損株 Δpyk 株においては、グルコース存在時において Δpfk 株で観察された著しい増殖阻害は観察されなかった (図 8 (C) および (D))。 Δpyk 株に、pCA24N Δgfp -*pykA* あるいは、pCA24N Δgfp -*pykF* を形質転換し、これらの遺伝子を過剰発現させたとき、酢酸を炭素源として利用する増殖状態 (OD₆₀₀=0.1 以降) において増殖速度の低下が観察された (図 8 (C) および (D))。

③ fructose-1,6-bisphosphatase 遺伝子 3 重欠損株 (*glpX*⁺) を用いた *fbp*、*glpX*、*yggF* および *ybhA* 遺伝子相補実験

fructose-1,6-bisphosphatase をそれぞれコードする *fbp*、*glpX*、*yggF*、*ybhA* 遺伝子を $\Delta 3$ -*glpX*⁺ 株に過剰発現させることで、各酵素が糖新生で必須と考えられる Fbp の機能を相補可能か検証した。*fbp* 遺伝子を過剰発現させた際、野生株と比較して増殖速度は小さいものであったが、*fbp* 欠損株で観察されたグルコース欠乏に伴う増殖停止 (図 6 (C)) が抑圧された (図 9 (A))。また、*glpX* 遺伝子を過剰発現させた際、グルコース欠乏後に増殖はできず、*fbp* 遺伝子を相補することはできなかった (図 9 (B))。*yggF* 遺伝子過剰発現株においては、 $\Delta 3$ -*glpX*⁺ 株では、*fbp* 遺伝子欠損によるグルコース欠乏による増殖停止を抑圧できなかった (図 9 (C))。*ybhA* 遺伝子過剰発現においては、*glpX*、*yggF* 遺伝子同様に $\Delta 3$ -*glpX*⁺ 株ではグルコース欠乏後に引き起こされる増殖停止を抑圧することはできなかった。さらに、野生株において *ybhA* 遺伝子を過剰発現させた際、著しい増殖阻害が観察された (図 9 (D))。これらの結果から、酢酸を炭素源とする M9 最少培地において Fbp の発現が必須であり、GlpX や YggF、YbhA では Fbp の機能を相補できないことが示唆された。

1.3.4 種々の炭素源における *ybhA* 過剰発現株の増殖曲線測定

前節において、大腸菌野生株 (BW25113 株) において プラスミド上から *ybhA* 遺伝子を過剰発現させた際、著しい増殖阻害が観察された (図 9 (D))。この原因として、グルコース取り込み、または、その代謝に異常が生じたことにより増殖阻害が引き起こされたと考えられた。大腸菌を始めとする細菌の多くは、グルコースを PTS (phosphotransferase system) により細胞内に取り込む (Kotrba et al., 2001)。グルコースだけでなく様々な炭素源を ABC トランスポーターや MFS トランスポーターを使い分けることにより細胞内へと取り込み、同化または異化する (Locher, 2009; Pao et al., 1998)。そこで、本節ではグルコースの他に glycerol、malate、galactose を炭素源とした際の *ybhA* 遺伝子過剰発現の増殖測定を行い、*ybhA* 遺伝子過剰発現により引き起こされる増殖阻害がグルコース特異的なものなのか検証を行った。

その結果、*ybhA* 遺伝子過剰発現はどの炭素源においても著しい増殖阻害を引き起こし、さらに興味深いことに一度増殖を開始すると野生株と同様の増殖を行った (図 10)。このことから、*YbhA* 過剰生産による増殖阻害は炭素源依存的な現象ではないことが考えられた。さらに、*ybhA* 遺伝子欠損株および過剰発現株での増殖測定および *LacZ* をレポータータンパク質としたプロモーター活性結果から、*YbhA* は炭素代謝に寄与しないことが示唆された。

1.3.5 LB 培地における *ybhA* 過剰発現株の増殖曲線測定

ybhA 遺伝子欠損株における増殖測定において、野生株と比較して表現型が観察されなかったが、興味深いことに野生株においてプラスミド上から *ybhA* 遺伝子を過剰発現させた際には著しい増殖阻害が観察され、それが炭素源に依存しないことが本研究では明らかとなった (図 6 (C)、図 9 (D) および図 10)。従って、*ybhA* 遺伝子過剰発現は細胞増殖に必須な代謝物の欠乏を招く、もしくは細胞増殖に対し毒性を示す代謝物の蓄積を引き起こすことが考えられた。

これらの可能性を検証するため、LB 培地において野生株で *ybhA* 遺伝子を過剰発現させた際の増殖を測定した。その結果、M9 最少培地で引き起こされた増殖阻害が引き起こされなかった (図 11)。このことから、細胞増殖に必須な代謝物の欠乏が *ybhA* 遺伝子過剰発現により引き起こされることが細胞増殖阻害の原因であることが示唆された。*YbhA* は *in vitro* screening 系により、fructose-1,6-bisphate だけでなく erythrose-4-phosphate、pyridoxal-5'-phosphate (vitamin B₆)、flavin mononucleotide、thiamin-pyrophosphate (vitamin B₁)、glucose-6-phosphate および ribose-5-phosphate に対して脱リン酸化活性を示すことが明らかにされており、生理機能未知の脱リン酸化酵素である (Kuznetsova et al., 2006)。本研究で得られたこれまでの研究結果から、*YbhA* は生理的に糖新生には関与しないことが示唆された。従って、*ybhA* 遺伝子過剰発現により引き起こされた著しい増殖阻害は、これらいずれかのリン酸化代謝物の欠乏に由来するものと考えられた。

1.3.6 補酵素前駆体添加時における *ybhA* 遺伝子過剰発現株の増殖測定

fructose-1,6-bisphosphatase としてアノテーションされていた YbhA は糖新生に寄与せず、また過剰発現させた際には炭素源に依存せず著しい増殖阻害を引き起こす。さらにこの増殖阻害は、細胞増殖に必須な代謝物の欠乏が引き起こされることが示唆されている。Kuznetsova らの報告によると、YbhA は炭素代謝に関与する酵素の補酵素 thiamine-pyrophosphate (TPP、vitamin B₁) および、アミノ酸やグリコーゲン代謝に関与する酵素の補酵素である pyridoxal-5'-phosphate (PLP、vitamin B₆) に対して脱リン酸化活性を示すことが明らかにされている。これらの補酵素は全生物において必須とされており、その欠乏は細胞増殖に影響を与えることが知られている (Begley et al., 1999; Fitzpatrick et al., 2007; John, 1995)。

そこで本節では、生物が必須とするこれらの補酵素を培養液中に加えた際の YbhA 過剰生産株の増殖を測定し、補酵素の枯渇が増殖の原因であるか検証することとした。しかし、TPP および PLP は大腸菌では直接細胞内に取り込まれないことが報告されている (Dempsey and Pachler, 1966; Nakayama and Hayashi, 1972)。そのため、TPP の前駆体として既に報告されている thiamine、また vitamin B₆ 前駆体として pyridoxal (PL)、pyridoxine (PN)、および pyridoxamine (PM) を培養液中に添加した際の *ybhA* 遺伝子過剰発現株の増殖を測定することとした。thiamine は thiamine kinase ThiK および thiamine monophosphate kinase ThiL による段階的リン酸化により、補酵素として生理活性を示す TPP に変換されることが報告されている (Begley et al., 1999)。また、PL は PL/PM/PN kinase PdxK および PL kinase PdxY によるリン酸化、PM および PN は PdxK および PMP/PNP oxidase PdxH による段階的なリン酸化と酸化により生理活性を示す PLP へと変換されることが明らかにされている (Lam and Winkler, 1992; Safo et al., 2004; Yang et al., 1996)。これら添加物による培養液の pH 変動を防ぎ、精度の高いデータを得るため緩衝能の高い MOPS 最少培地 (Neidhardt et al., 1974) を用いた。大腸菌野生株に pCA24NΔ*gfp-ybhA* を形質転換した形質転換体を 0.2% グルコースを炭素源と

したときの MOPS 最少培地で培養し、増殖を測定した (図 12)。その結果、thiamin 添加では *ybhA* 遺伝子過剰発現による増殖阻害を抑圧できなかった (図 12 (A))。その一方で、PL、PM、PN を添加した際、*ybhA* 遺伝子過剰発現による増殖阻害が抑圧された (図 12 (B))。これらの結果から、*ybhA* 遺伝子過剰発現による増殖阻害は PLP 欠乏に由来することが示唆された。

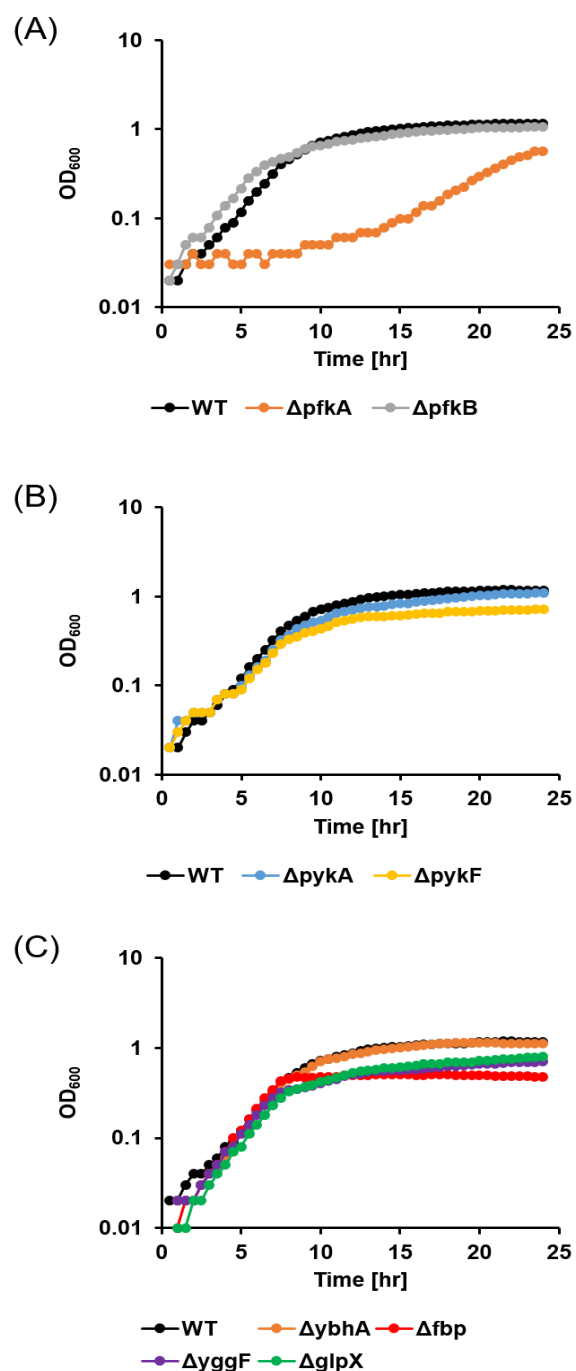


図 6 解糖系および糖新生を触媒する各 Isozyme 遺伝子欠損株の増殖曲線
 0.02% グルコース、および、0.02% 酢酸を炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した
 M9 最少培養液において 30°C、150 rpm で振とう培養し、OD₆₀₀ を測定した。(A)
 phosphofructokinase *pfkA* および *pfkB* 欠損株、(B) pyruvate kinase *pykA* および *pykF* 欠
 損株、(C) fructose-1,6-bisphosphatase *fbp*、*ybhA*、*glpX* および *yggF* 欠損株。

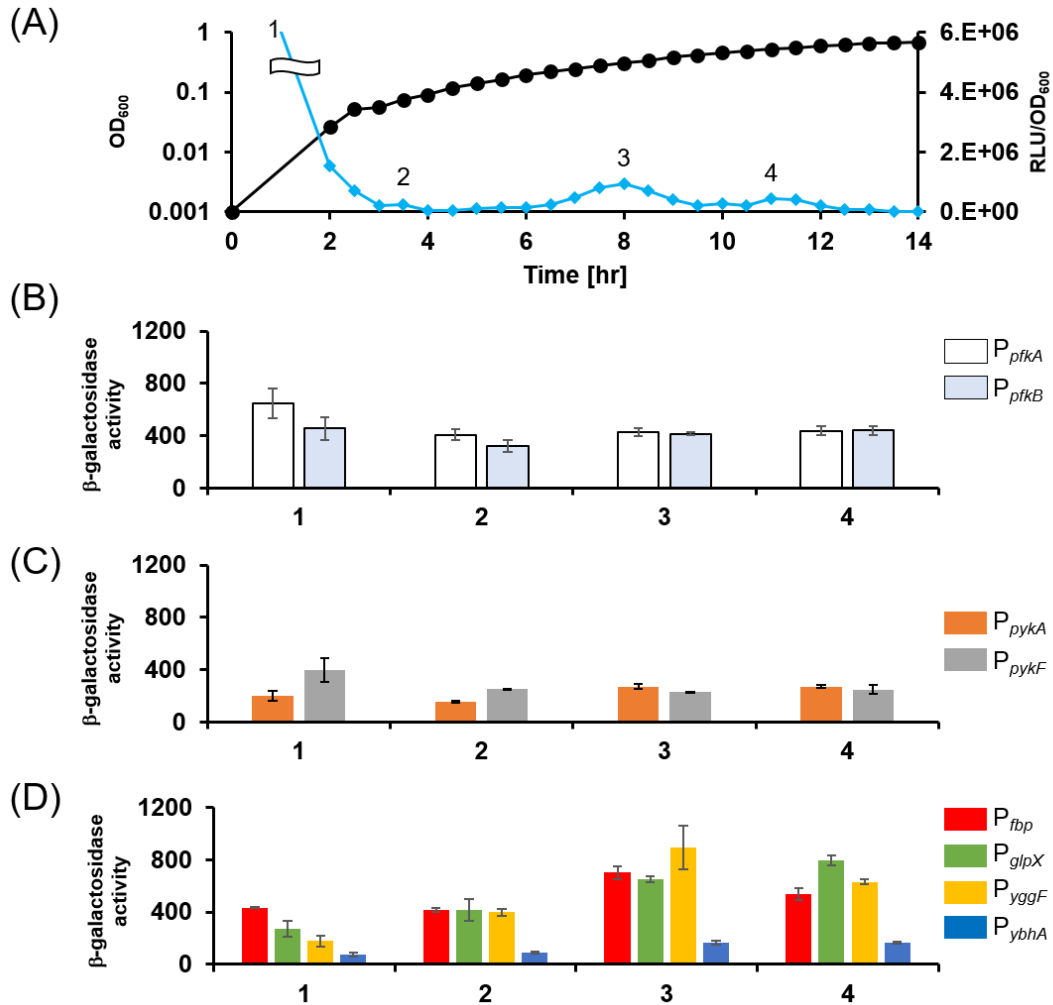


図 7 代謝状態遷移時 (図 5) における各 Isozyme 遺伝子プロモーター活性測定
T 字型試験管内で 0.02% グルコース、および、0.02% 酢酸を炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 最少培養液において 30°C、25 rpm で振とう培養した。(A) 大腸菌野生株 (BW25113 株) に pLXUV5 プラスミドを形質転換し、OD₆₀₀ (黒線) および luciferase activity (青線) を測定した。(B)-(D) Luciferase 活性を示すグラフにおける数字はそれぞれ 1: 解糖系利用時、2: 代謝状態遷移時、3: TCA 回路または糖新生経路利用状態、4: 酢酸欠乏後アミノ酸異化代謝状態に相当する (Shimada and Tanaka, 2016)。それぞれのピークに合わせ、β-galactosidase activity を測定するためのサンプリングを行い、β-galactosidase activity を測定した。(B) 各 phosphofructokinase 遺伝子プロモーター活性、(C) 各 pyruvate kinase 遺伝子プロモーター、(D) 各 fructose-1,6-bisphosphatase 遺伝子プロモーター活性。

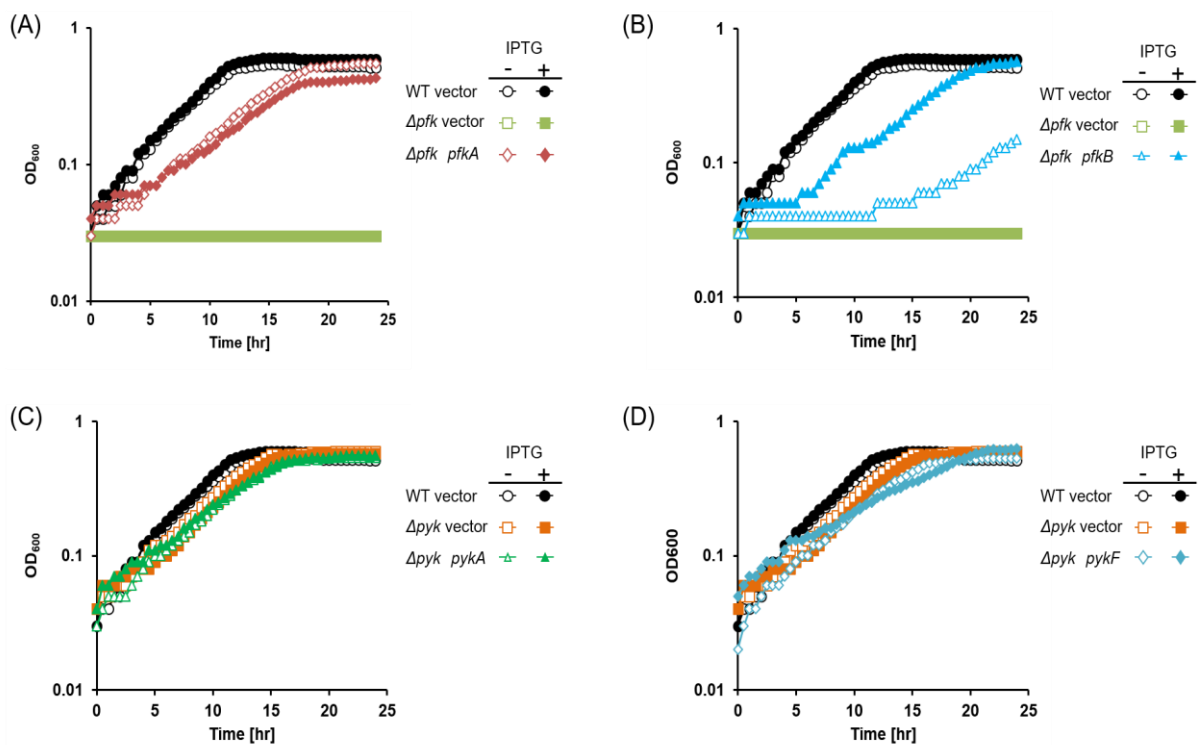


図 8 phosphofruktokinase および pyruvate kinase 遺伝子多重欠損株における各 Isozyme 遺伝子過剰発現時の増殖測定

0.02% グルコース、および、0.02% 酢酸を炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 最少培養液において 30°C、150 rpm で振とう培養し、OD₆₀₀ を測定した。IPTG は、終濃度 500 μM になるよう同培地に添加した。大腸菌野生株 (BW25113 株、図中 WT) または (A)-(B) *Δpfk* 株に、pCA24N*Δgfp*-empty (図中 vector)、(A) pCA24N*Δgfp-pfk* (図中 *pfkA*)、(B) pCA24N*Δgfp-pfkB* (図中 *pfkB*)、(C)-(D) *Δpyk* 株に pCA24N*Δgfp-pykA* (図中 *pykA*)、または (D) pCA24N*Δgfp-pykF* (図中 *pykF*) を形質転換し、上記培地にて増殖曲線を測定した。

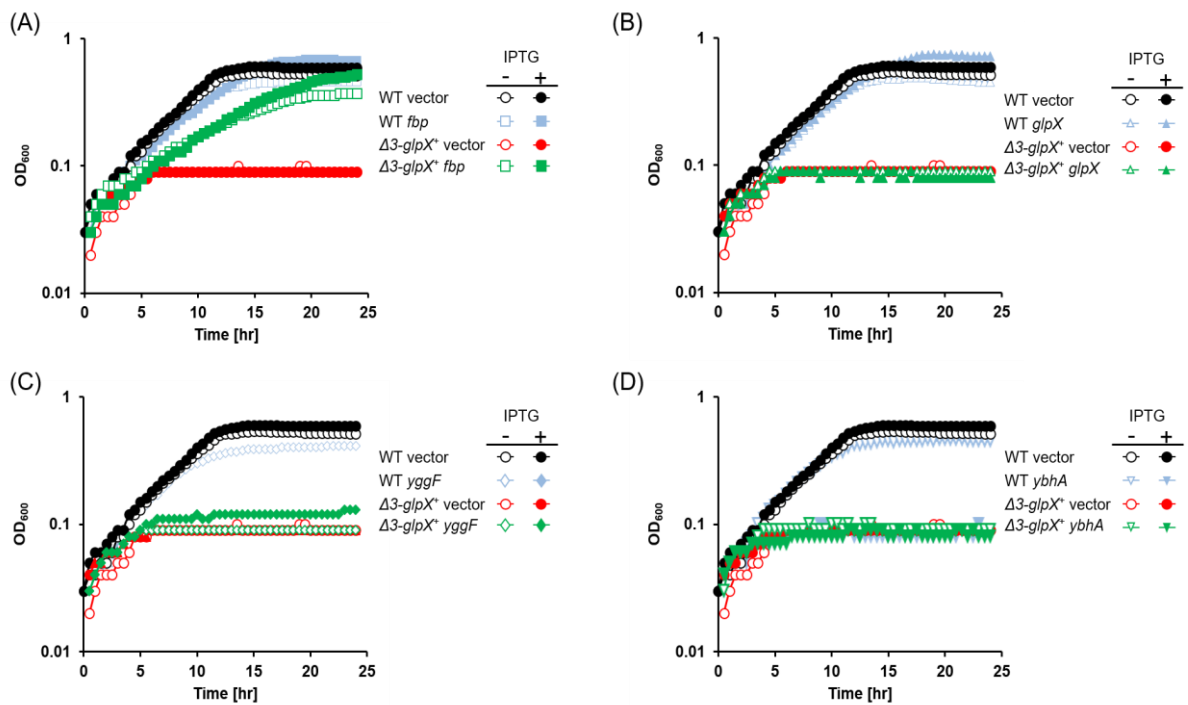


図 9 fructose-1,6-bisphatase 遺伝子多重欠損株における各 Isozyme 遺伝子過剰発現時の増殖測定

0.02% グルコース、および、0.02% 酢酸を炭素源とし、0.2% casamino acids を添加した M9 最少培地において 30°C、150 rpm で振とう培養し、OD₆₀₀ を測定した。IPTG は、終濃度 500 μM になるよう同培地に添加した。大腸菌野生株 (BW25113 株、図中 WT) または $\Delta 3\text{-glpX}^+$ 株に、pCA24N Δgfp -empty (図中 vector)、(A) pCA24N $\Delta gfp\text{-fbp}$ (図中 *fbp*)、(B) pCA24N $\Delta gfp\text{-glpX}$ (図中 *glpX*)、(C) pCA24N $\Delta gfp\text{-yggF}$ (図中 *yggF*)、または (D) pCA24N $\Delta gfp\text{-ybhA}$ (図中 *ybhA*) を形質転換し、上記培地にて増殖曲線を測定した。

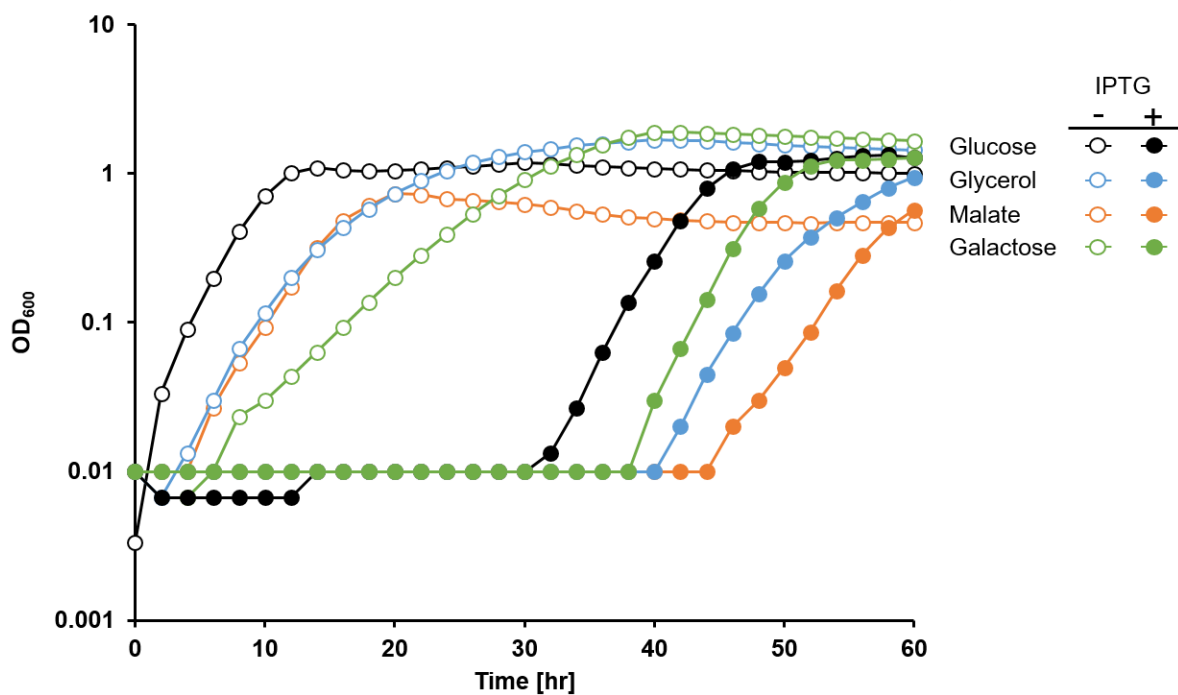


図 10 YbhA 過剰生産による増殖阻害は炭素源に依存しない

大腸菌野生株 (BW25113 株) に pCA24N Δ gfp-ybhA プラスミドを形質転換し、各炭素源が終濃度 0.2% になるよう添加された M9 最少培地で 30°C、150 rpm で振とう培養した。OD₆₀₀ は 2 時間ごとに測定した。ybhA 遺伝子過剰発現の際、500 μ M IPTG を培養液中に添加した。

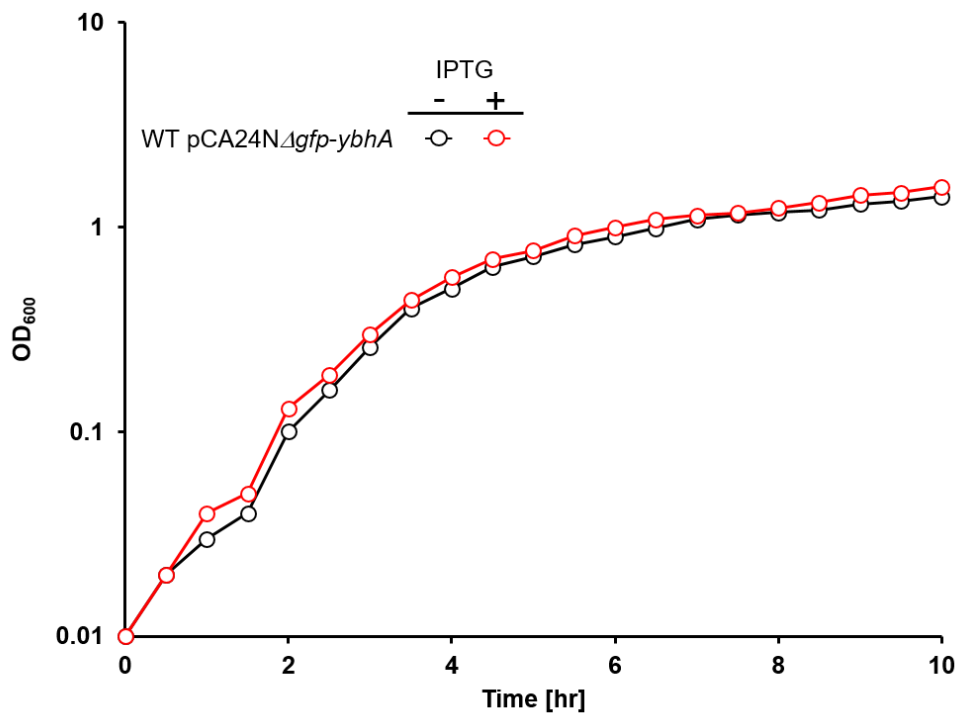


図 11 LB 培地では YbhA 過剰生産による増殖阻害が生じない

大腸菌野生株 (BW25113 株) に pCA24NΔgfp-ybhA プラスミドを形質転換し、LB 培地で 30°C、150 rpm で振とう培養した。OD₆₀₀ は 30 分毎に測定した。ybhA 遺伝子過剰発現の際、500 μM IPTG を培養液中に添加した。

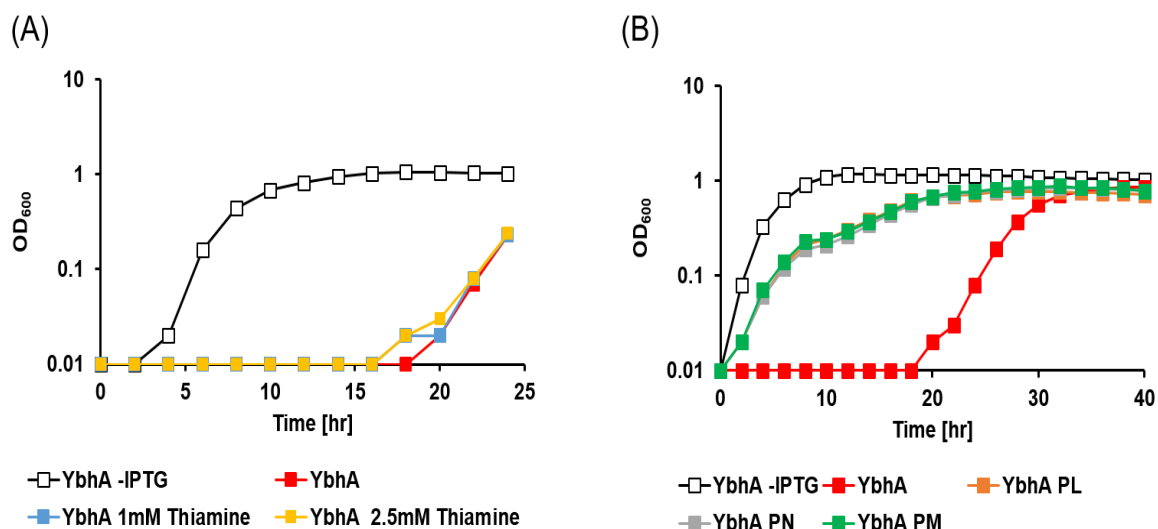


図 12 YbhA 過剰生産による増殖阻害は vitamin B₆ 類の添加により抑圧される
 pCA24NΔ*gfp-ybhA* プラスミドを保持する大腸菌形質転換体 (図中 YbhA) を 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を用いて 30°C、150 rpm で培養した際の増殖曲線。OD₆₀₀ は 2 時間ごとに測定した。IPTG は終濃度 500 μM になるよう培養液中に添加した。(A) vitamin B₁ 前駆体 thiamine 添加による YbhA 過剰生産株の増殖への影響評価、(B) vitamin B₆ 前駆体 pyridoxal (PL)、pyridoxine (PN)、および pyridoxamine (PM) 添加時における増殖曲線。vitamin B₆ 前駆体類は終濃度 100 μM になるよう培養液中に添加した。

1.4 考察およびまとめ

本章では、解糖系および糖新生における不可逆反応が Isozyme により触媒される点に着目し、グルコースから酢酸へ炭素源が遷移する際における個々の Isozyme の役割を理解することで代謝経路調節機構の解明に取り組んだ。その一環として、グルコース制限条件下において各 Isozyme 遺伝子欠損株の増殖曲線を測定した (図 6)。

① phosphofructokinase 解析結果

fructose-6-phosphate を fructose-1,6-bisphosphate へのリン酸化を触媒する phosphofructokinase に関しては、PfkA が主にその反応を触媒しており、PfkB の過剰生産により PfkA の機能を相補することが可能であることが明らかとなった (図 6 (A)、図 8 (B))。Δ*pfk* 株に pCA24NΔ*gfp-pfkA* プラスミドを形質転換し、グルコース制限条件下において増殖曲線を測定した際、IPTG による遺伝子発現誘導を行わなかった培養液において、細胞増殖が確認された (図 8 (A))。pCA24NΔ*gfp* プラスミドでは、P_{T5lac} プロモーターが遺伝子発現に利用されており、誘導物質がなくてもプロモーター活性を示す leaky プロモーターであることが報告されている (Kitagawa et al., 2005)。従って、発現が IPTG が添加されなかった場合においても行われ、PfkA が発現されたと考えられる。

LacZ を用いたプロモーター活性測定においては、解糖系を主に利用しエネルギーを獲得している代謝状態においては、*pfkA* プロモーター活性は *pfkB* 遺伝子と比較し 1.5 倍程度高く、著しい違いは観察されなかった。(図 7 (B))。この結果は、PfkA および PfkB において遺伝子発現量に依存した酵素活性制御は行われていないことを示唆している。

グルコースを炭素源として主に解糖系を利用してエネルギー獲得を行う際には、PfkA が主要な phosphofructokinase として機能することを支持するものであると考えられる。本研究により観察された PfkA の優位性は、既に Kotlarz らの研究グループにより証明されており、PfkB に比べその酵素活性が 20 倍高く、PfkA が生理的に主要な phosphofructokinase であることが明らかにされていた (Kotlarz et al., 1975)。さらに、Δ*pfkA*

株および phosphofructokinase 遺伝子完全欠損株 (Δpfk 株) で観察された著しい増殖速度の低下が、 $pfkB$ 遺伝子過剰発現株により改善されることも既に報告されていた (Robinson and Fraenkel, 1978)。従って、本研究で得られた実験結果は、これらの報告の再評価に留まった。

② pyruvate kinase 解析結果

PEP を pyruvate へと変換する触媒能を持つ pyruvate kinase においては、酢酸を炭素源として利用する代謝状態では $pykF$ 遺伝子欠損株および $pykA$ 遺伝子欠損株において、大腸菌野生株と比較して増殖速度の低下が観察された (図 6 (B))。酢酸利用時に観察された増殖速度の低下は、両遺伝子欠損株 Δpyk 株においても同様であった (図 8 (C) および (D))。さらに、 $pykF$ または $pykA$ 遺伝子過剰発現ではこの表現型が消失されなかったことから、酢酸を炭素源として TCA 回路または糖新生を利用している状態においては、PykF および PykA が協奏的に機能することにより、細胞増殖が支持される事が示唆された (図 8 (C) および (D))。pyruvate は、serine 生合成のための基質となるだけでなく、脂質生合成の基質である acetyl-CoA の供給源でもあるため、pyruvate の欠乏は増殖阻害を呈すると考えられる。その一方で、培養液中に グルコース が存在するとき、phosphotransferase system コンポーネントの一つ PtsI (Enzyme I^{sugar}) により phosphoenol pyruvate から pyruvate への変換が触媒され供給されるため、pyruvate kinase 遺伝子欠損による表現型が表れなかったものと考えられる。また、大腸菌をモデル生物とし、グルコースを炭素源とする M9 最少培地で pyruvate kinase 遺伝子欠損株における ¹³C を利用した carbon flux 解析から、phosphoenol pyruvate carboxylase (Ppc)、malate dehydrogenase (Mdh)、malic enzymes (MaeA および MaeB) を介在した carbon flux rerouting により pyruvate が供給されることが報告されている (Emmerling et al., 2002)。中心代謝経路が大腸菌とほぼ同様の系である *Corynebacterium glutamicum* において pyruvate kinase 遺伝子欠損により、酢酸を炭素源とする最少培地では増殖阻害が

生じることが既に報告されている (Netzer et al., 2004)。Netzer らの報告によれば、malate の脱炭酸反応を触媒し pyruvate へと変換する malic enzyme 遺伝子 *malE* の過剰発現により、この表現型が解消されることが明らかにされた。この報告は、酢酸を炭素源とした際、malic enzyme による pyruvate の生合成が細胞増殖に極めて重要であることを示唆している。総合すると、本研究により得られた結果は、pyruvate kinase 遺伝子欠損株における酢酸利用時の表現型を捉えることには成功したが、主目的である炭素源遷移時における PykF および PykA 間の生理機能の違いを捉えることはできなかった。

③ fructose-1,6-bisphosphatase 解析結果

fructose-1,6-bisphosphate を fructose-6-phosphate へと変換する触媒能を持つ fructose-1,6-bisphosphatase 活性を有する各 Isozyme の炭素源遷移時における解析では、単一遺伝子欠損株および多重欠損株における各 Isozyme 遺伝子の過剰発現株の増殖曲線測定からは、Fbp がグルコース欠乏後、酢酸を炭素源としたエネルギー獲得および細胞構成要素の生合成に必須であることが示唆された。その一方で、GlpX および YggF は fructose-1,6-bisphosphatase としての活性が低く、YbhA は生理的にその活性を示さないことが示唆された (図 6 (C)、図 9)。Fraenkel および Donahue らは、大腸菌 fructose-1,6-bisphosphatase に関して *in vitro* 系を用いた酵素活性測定を行い Fbp が糖新生において必須な酵素であり主要な fructose-1,6-bisphosphatase であり、GlpX および YggF は Fbp と比較して酵素活性がそれぞれ 30 倍、90 倍低いことが明らかにされており、単一遺伝子欠損株で得られた実験結果もこれに基づくものとなった (Brown et al., 2009; Donahue et al., 2000; Fraenkel and Horecker, 1965)。

YbhA のみは fructose-1,6-bisphosphatase として生理活性を示す結果を本研究においては得られなかった (図 6 (C))。そして、YbhA 過剰生産による増殖阻害が、アミノ酸およびグリコーゲン代謝に関連する酵素の補酵素である vitamin B₆ PLP の欠乏に起因することが示唆された (図 12)。この結果は、大腸菌は vitamin B₆ を過剰に蓄積しない

細胞システムを保持しており、vitamin B₆ の蓄積が大腸菌の生理機能に何らかの不具合をもたらすことを暗に示していると考えられる。

本章をまとめると、本研究では解糖系および糖新生において律速段階である不可逆過程を触媒する phosphofructokinase、pyruvate kinase、そして fructose-1,6-bisphosphatase に関して炭素源遷移時における個々の Isozyme の解析を行ったが、既に行われている現象が観察された一方で、*in vitro* screening 系の報告のみで生理機能未知脱リン酸化酵素 YbhA が fructose-1,6-bisphosphatase としてアノテーションされていたが (Kuznetsova et al., 2006)、本研究では vitamin B₆ 代謝に関与することが示唆された (図 12)。従って、生理的な機能未知遺伝子または酵素の機能解明は細胞内での役割を理解する上で、極めて重要なプロセスであることが分かる。

参考文献

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008.

Becker, J., Klopprogge, C., Zelder, O., Heinzle, E., and Wittmann, C. (2005). Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8587–8596.

Begley, T. P., Downs, D. M., Ealick, S. E., McLafferty, F. W., Van Loon, A. P. G. M., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H. J., Kinsland, C., Reddick, J. J., and Xi, J. (1999). Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch. Microbiol.*, **171**, 293–300.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **62**, 293–300.

Brown, G., Singer, A., Lunin, V. V, Proudfoot, M., Skarina, T., Flick, R., Kochinyan, S., Sanishvili, R., Joachimiak, A., Edwards, A. M., Savchenko, A., and Yakunin, A. F. (2009). Structural and biochemical characterization of the type II fructose-1,6-bisphosphatase GlpX from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **284**, 3784–3792.

Cherepanov, P. P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, **158**, 9–14.

Dempsey, W. B., and Pachler, P. F. (1966). Isolation and characterization of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **91**, 642–645.

Donahue, J. L., Bownas, J. L., Niehaus, W. G., and Larson, T. J. (2000). Purification and Characterization of *glpX*-Encoded Fructose 1,6-Bisphosphatase, a New Enzyme of the Glycerol 3-Phosphate Regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **182**, 5624–5627.

Emmerling, M., Dauner, M., Ponti, A., Hochuli, M., Szyperski, T., Wüthrich, K., Bailey, E., Sauer, U., Fiaux, J., Wu, K., and Bailey, J. E. (2002). Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 152–164.

Fitzpatrick, T. B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., Tews, I., and Raschle, T. (2007). Two independent routes of *de novo* vitamin B₆ biosynthesis: not that different after all. *Biochem. J.*, **407**, 1–13.

Fraenkel, D. G., and Horecker, B. L. (1965). Fructose-1, 6-diphosphatase and acid hexose phosphatase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **90**, 837–842.

Fraenkel, D. G. (1987). Glycolysis, Pentose Phosphate Pathway, and Entner-Doudoroff Pathway, *In* Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E. (ed.), *ESCHERICHIA COLI AND SALMONELLA TYPHIMURIUM: CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY*, 1st ed, ASM Press, Washington, D.C., 142-150.

Gama-Castro, S., Jiménez-Jacinto, V., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Peñaloza-Spinola, M. I., Contreras-Moreira, B., Segura-Salazar, J., Muñiz-Rascado, L., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Bonavides-Martínez, C., Abreu-Goodger, C., Rodríguez-Penagos, C., Miranda-Ríos, J., Morett, E., Merino, E., Huerta, A. M., Treviño-Quintanilla, L., and Collado-Vides, J. (2008). RegulonDB (version 6.0): Gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 120–124.

Heinemann, M., and Sauer, U. (2010). Systems biology of microbial metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 337–343.

John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.*, **1248**, 81–96.

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., and Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.*, **12**, 291–9.

Koga, K., Harada, T., Shimizu, H., and Tanaka, K. (2005). Bacterial luciferase activity and the intracellular redox pool in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics*, **274**, 180–188.

Kotlarz, D., Garreau, H., and Buc, H. (1975). Regulation of the amount and of the activity of phosphofructokinases and pyruvate kinases in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **381**, 257–268.

Kotrba, P., Inui, M., and Yukawa, H. (2001). REVIEW Bacterial Phosphotransferase System (ITS) in Carbohydrate Uptake and Control of Carbon Metabolism. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 502–517.

Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I., Carmel, L., Wolf, Y. I., Mori, H., Savchenko, A. V., Arrowsmith, C. H., Koonin, E. V., Edwards, A. M., and Yakunin, A. F. (2006). Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J. Biol. Chem.*, **281**, 36149–36161.

Lam, H. M., and Winkler, M. E. (1992). Characterization of the complex *pdxH-tyrS* operon of *Escherichia coli* K-12 and pleiotropic phenotypes caused by *pdxH* insertion mutations. *J. Bacteriol.*, **174**, 6033–6045.

Locher, K. P. (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **364**, 239–245.

Nakayama, H., and Hayashi, R. (1972). Biosynthesis of thiamine pyrophosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **109**, 936–938.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria Culture Medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736–747.

Netzer, R., Krause, M., Rittmann, D., Peters-Wendisch, P. G., Eggeling, L., Wendisch, V. F., and Sahm, H. (2004). Roles of pyruvate kinase and malic enzyme in *Corynebacterium glutamicum* for growth on carbon sources requiring gluconeogenesis. *Arch. Microbiol.*, **182**, 354–363.

Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1–34. Retrieved from

Park, J. H., Lee, K. H., Kim, T. Y., and Lee, S. Y. (2007). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 7797–802.

Robinson, J. P., and Fraenkel, D. G. (1978). Allosteric and non-allosteric *E. coli* phosphofructokinases: effects on growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 858-863.

Safo, M. K., Musayev, F. N., Hunt, S., Martino, L., Scarsdale, N., Schirch, V., and Salvo, M. L. (2004). Crystal Structure of the PdxY Protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **186**, 8074–8082.

Shimada, T., and Tanaka, K. (2016). Use of a Bacterial Luciferase Monitoring System To Estimate Real-Time Dynamics of Intracellular Metabolism in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5960-5968.

Simons, R. ., Houman, F., and Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85–96.

Sundara Sekar, B., Seol, E., Mohan Raj, S., and Park, S. (2016). Co-production of hydrogen and ethanol by *pfkA*-deficient *Escherichia coli* with activated pentose-phosphate pathway: reduction of pyruvate accumulation. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 95.

Yang, Y., Zhao, G., and Winkler, M. E. (1996). Identification of the *pdxK* gene that encodes pyridoxine (vitamin B₆) kinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 89–95.

2 章

大腸菌におけるピリドキサル-5'-リン酸の恒常性における脱リン酸化酵素 YbhA の役割

1. 序論

1.1 Vitamin B₆ (PLP: Pyridoxal-5'-phosphate) の特性および生理学的意義

細胞においてアミノ酸は、細胞を構成するために必要なタンパク質の構成要素となるだけでなく、核酸の構成要素であるプリン・ピリミジン骨格、および、栄養飢餓時における炭素・窒素源の供給源としても重要な役割を果たす事が知られている。従って、アミノ酸代謝（生合成・分解）は、細胞にとって重要な細胞プロセスであると捉えることができる。

Vitamin B₆ は生化学的に相互転換性を有する 3-hydroxy-2-methylpyridine の 6 つの化合物（Pyridoxal (PL)、Pyridoxal-5'-phosphate (PLP)、Pyridoxine (PN)、Pyridoxine 5'-phosphate (PNP)、PM (Pyridoxamine)、PMP (Pyridoxamine 5'-phosphate)）(図 13) の総称であり、PLP のみが生理活性を示し、全生物が必須とする。PLP は、主にアミノ酸代謝に関連する反応（アミノ基転移、脱炭酸、ラセミゼーション、 β/γ -炭素の除去・置換）を触媒する酵素の補酵素として機能する。さらに、アミノ酸代謝だけではなく、グリコーゲン代謝を触媒する酵素の補酵素としても機能することがこれまでの研究により明らかにされてきた (John, 1995; Percudani and Peracchi, 2003, 2009)。また、酵母において、PLP がエネルギー代謝を触媒する酵素の補酵素として機能する Vitamin B₁ (Thiamine) の前駆体となることが示唆されている (Zeidler et al., 2001)。

PLP が示す多様な酵素との親和性は、PLP が持つ 4'位アルデヒド基によるリジン残基との Schiff 塩基形成反応が平衡反応であるために、タンパク質を始めとする他のアミノ基が存在する条件下では、容易に他のアミノ基との交換反応が進行し、新たな別の Schiff 塩基が形成されることに起因すると考えられている (John, 1995; Salvo et al., 2012)。次世代シーケンサーの登場により、膨大なゲノム情報が蓄積され、PLP 依存酵素の多様性に関して検証が進められ、原核細胞においてはゲノム上の遺伝子の 1.5%、真核細胞においては 0.5-1.0% の遺伝子が PLP 依存酵素をコードすることが予測されている。さらに、それらの酵素が関与する触媒反応の種類は 140 種類以上存在すると考えられている (Percudani and Peracchi, 2003)。

従って、PLP は細胞増殖および代謝を支える極めて重要な補酵素の一つとして考えることができる。

1.2 PLP 生合成経路および恒常性維持の重要性

PLP のみが補酵素として生理活性を示すことから、PLP の生合成経路に関して多くの研究が展開されてきた。そして、大腸菌を始めとする細菌・植物・菌類において、Deoxyxylulose 5'-phosphate (DXP) 依存または非依存の 2 種類の生合成経路、および PL や PM、PN から PLP へと変換するサルベージ経路が解明されてきた (図 14)。一方で動物細胞は新規生合成経路を持たないことから、食事、またはサルベージ経路による PLP 獲得が必須であるとされている (Fitzpatrick et al., 2007)。大腸菌などの γ -proteobacteria は 7 酵素 (Epd、Dxs、PdxB、SerC、PdxA、PdxJ、PdxH) が DXP を中間代謝産物とする DXP 依存経路を形成し、PLP を生合成する (Fitzpatrick et al., 2007)。その一方で、植物や菌類、枯草菌等細菌の多くは 2 酵素 (Pdx1、Pdx2) から構成される DXP 非依存経路により PLP が生合成される (図 14) (Ehrenshaft et al., 1999; Mittenhuber, 2001; Tambasco-Studart et al., 2005)。

PLP は細胞にとって必須の補酵素であり、その欠乏は癲癇性脳症の発症に関与することが示唆されている (Gospe, 2009; Musayev et al., 2009)。一方で、PLP は 4'位アルデヒド基に由来する高反応性を示す化合物であり、非特異的にタンパク質中のリジン残基やアミン、システイン残基と反応し酵素を不活化する側面を持つ。このことは *in vitro* 系での検証により明らかにされており (Hisao and Claudio, 1981; Vermeersh et al., 2004)、細胞内での PLP の蓄積は細胞増殖に対し影響を与えることが考えられる。しかし、PLP 誘導体である PMP や PNP 蓄積時における細胞増殖への影響が研究されるに留まり、PLP そのものの蓄積に関して、また PLP 蓄積を防ぐ分子機構に関する研究はあまり行われていない (Colinas et al., 2016; Prunetti et al., 2016)。モデル生物大腸菌を用いた既往研究にて、PLP 新規生合成経路の最終反応を触媒する PNP/PMP oxidase PdxH およびサルベ

ーシ経路の始発反応を触媒する PL/PM/PN kinase PdxK が PLP によるフィードバック阻害を受けることが明らかにされている (図 14) (Ghatge et al., 2012; Roseann and Walter, 1970; Zhao and Winkler, 1995)。この PLP によるフィードバック阻害は、過剰な PLP 蓄積を阻害し適正濃度を維持するための機構の一つだと考えられる。上述のとおり、PLP の新規合成は PLP による PdxH、PdxK に対するフィードバック阻害により制御されていると考えられるが、この他にも動物細胞において PLP 特異的な脱リン酸化酵素が同定されている(Fonda, 1992; Gao and Fonda, 1994)。従って、PLP の生合成制御および脱リン酸化により、PLP の恒常性が厳密に維持されていると考えられる。大腸菌由来の溶菌液から PLP 脱リン酸化活性が示されているが、PLP 特異的脱リン酸化酵素および遺伝子の同定は行われておらず、明らかにされていない (Yang et al., 1998)。

1.3 研究の目的

前述のように、PLP は Vitamin B₆ において補酵素として唯一生理活性を示し、細胞増殖および代謝を支える極めて重要な化合物であり、細胞内濃度は厳密に制御されていると考えられる。しかし、PLP 欠乏の生理的な影響については、これまでに多くの知見が蓄積されているが、PLP 過剰による細胞生理への影響はほとんど明らかにされておらず、PLP 恒常性維持機構に関する全容は未だ解明されていない。

本博士論文 1 章において、糖新生を触媒する fructose-1,6-bisphosphatase の Isozyme としてアノテーションされている生理機能未知脱リン酸化酵素 YbhA が PLP phosphatase であることが示唆された (1.3.6 節参照)。その結果から、YbhA が PLP を脱リン酸化し、細胞内過剰蓄積を阻害することにより PLP 恒常性維持に寄与することが考えられる。すなわち、PLP 過剰蓄積は細胞システムに何らかの障害を引き起こし、細胞増殖に影響を与えることが予想される。

そこで本章では、モデル生物大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いて、未観測である PLP 蓄積による細胞増殖への影響評価、および、それを解消する酵素の同定を試み、PLP 恒常性維持機構の一端を明らかにすることを目指した。

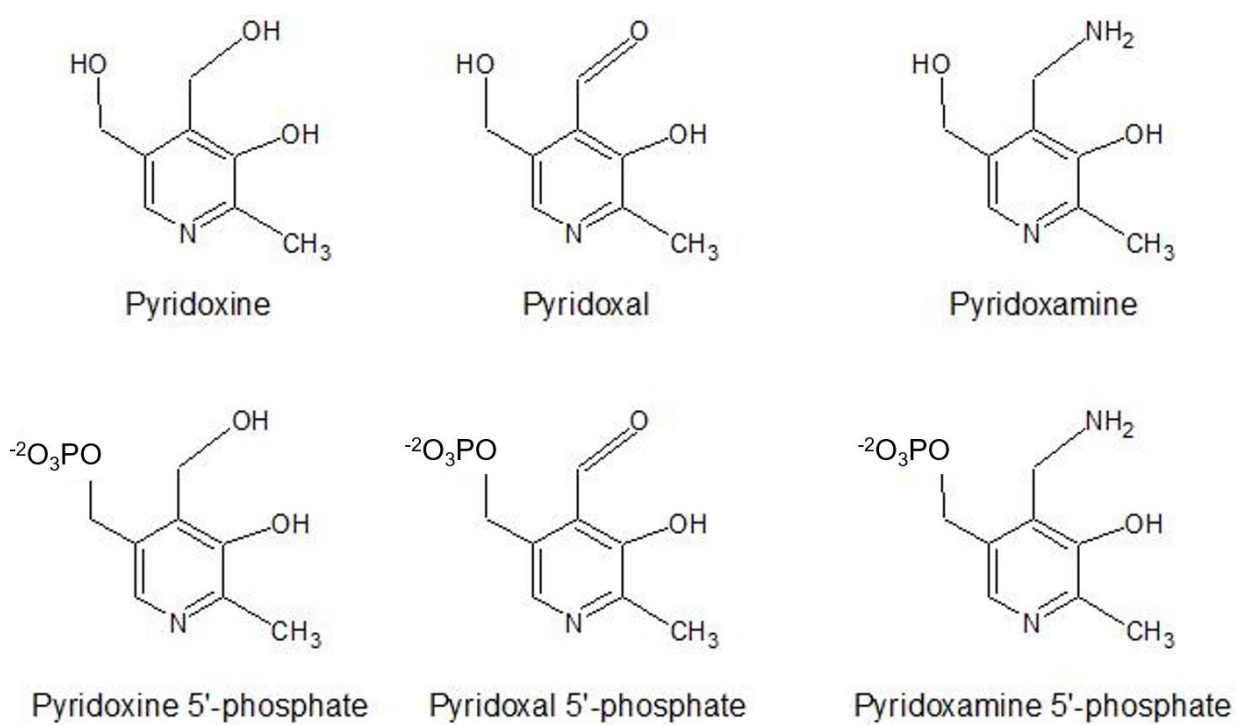
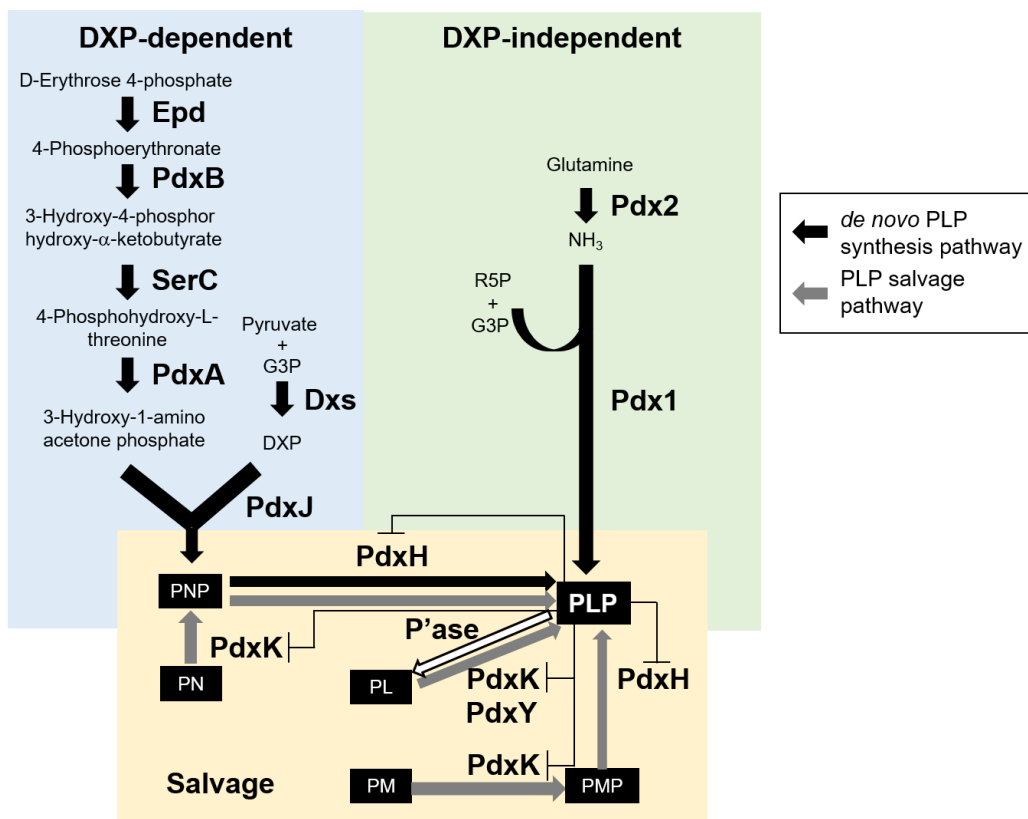


図 13 Vitamin B₆ 群構造式



(Fitzpatrick et al., 2007)より引用、改変)

図 14 PLP 新規生合成/サルベージ経路

黒矢印は PLP 新規生合成経路を、灰矢印はサルベージ経路を示す。DXP 依存経路およびサルベージ経路は、主に *Escherichia coli* を用いた研究により解明された経路を、DXP 非依存経路は *Cercospora nicotianae*、および、*Aspergillus nidulans* を用いた研究により解明された経路を示している (Ehrenshaft et al., 1999; Fitzpatrick et al., 2007; Osmani, May, and Osmani, 1999)。中抜き白矢印は、PLP を PL へと脱リン酸化する反応を触媒する (非)特異的 phosphatase を表している。PLP による PNP/PMP oxidase PdxH、PL/PM/PN kinase PdxK に対するフィードバック阻害は、⊥ マークにより示した (Ghatge et al., 2012; Zhao and Winkler, 1995)。

参考文献

- Colinas, M., Eisenhut, M., Tohge, T., Pesquera, M., Fernie, A. R., Weber, A. P. M., and Fitzpatrick, T. B. (2016). Balancing of B₆ vitamers is essential for plant development and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **28**, 1–15.
- Ehrenshaft, M., Bilski, P., Li, M. Y., Chignell, C. F., and Daub, M. E. (1999). A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B₆ biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 9374–9378.
- Fitzpatrick, T. B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., Tews, I., and Raschle, T. (2007). Two independent routes of *de novo* vitamin B₆ biosynthesis: not that different after all. *Biochem. J.*, **407**, 1–13.
- Fonda, M. L. (1992). Purification and characterization of vitamin B₆-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15978–15983.
- Gao, G., and Fonda, M. L. (1994). Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B₆ phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7163–7168.
- Ghatge, M. S., Contestabile, R., di Salvo, M. L., Desai, J. V., Gandhi, A. K., Camara, C. M., Florio, R., González, I. N., Parroni, A., Schirch, V., and Safo, M. K. (2012). Pyridoxal 5'-Phosphate is a Slow Tight Binding Inhibitor of *E. coli* Pyridoxal Kinase. *PLoS One*, **7**, 16–19.
- Gospe, S. M. (2009). Neonatal vitamin-responsive epileptic encephalopathies. *Chang Gung Med. J.*, **33**, 1–12.
- Hisao, O., and Claudio, G. (1981). Structure-function Relationship in *Escherichia coli* Initiation Factors. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4905–4912.
- John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81–96.
- Mittenhuber, G. (2001). Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B₆ (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 1–20.

Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Saavedra, M. A., Contestabile, R., Ghatge, M. S., Haynes, A., Schrich, V., and Safo, M. K. (2009). Molecular basis of reduced pyridoxine 5'-phosphate oxidase catalytic activity in neonatal epileptic encephalopathy disorder. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30949–30956.

Osmani, A. H., May, G. S., and Osmani, S. A. (1999). The extremely conserved *pyroA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23565–23569.

Percudani, R., and Peracchi, A. (2003). A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.*, **4**, 850–854.

Percudani, R., and Peracchi, A. (2009). The B₆ database: a tool for the description and classification of vitamin B₆-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*, **10**, 273.

Prunetti, L., El Yacoubi, B., Schiavon, C. R., Kirkpatrick, E., Huang, L., Bailly, M., El Badawi-Sidhu, M., Harrison, K., Gregory, J. F., Fiehn, O., Hanson, A. D., & De Crécy-Lagard, V. (2016). Evidence that COG0325 proteins are involved in PLP homeostasis. *Microbiol.*, **162**, 694–706.

Roseann, S. W., and Walter, B. D. (1970). Purification and Properties of Vitamin B₆ Kinase from *Escherichia coli* B. *Biochemistry*, **9**, 4057–4064.

Salvo, M. L., Budisa, N., and Contestabile, R. (2012). PLP-dependent Enzymes : a Powerful Tool for Metabolic Synthesis of non-canonical amino acids. Beilstein Bozen Symp. *Mol. Eng. Control*, 27–66.

Tambasco-Studart, M., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N., and Fitzpatrick, T. B. (2005). Vitamin B₆ biosynthesis in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 13687–92.

Vermeersh, J. J., Christmann-Franck, S., Karabashyan, L. V., Femandjian, S., Mirambeau, G., and Der Garabedian, P. A. (2004). Pyridoxal 5'-phosphate inactivates DNA topoisomerase IB by modifying the lysine general acid. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5649–5657.

Yang, Y., Tsui, H. T., Man, T., and Winkler, M. E. (1998). Identification and Function of the *pdxY* Gene, Which Encodes a Novel Pyridoxal Kinase Involved in the Salvage Pathway of Pyridoxal 5'-Phosphate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1814–1821.

Zeidler, J., Ullah, N., Gupta, R. N., Pauloski, R. M., Sayer, B. G., and Spenser, I. D. (2001). 2'-Hydroxypyridoxal, a Biosynthetic Precursor of Vitamins B₆ and B₁ in Yeast. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4542–4543.

Zhao, G., and Winkler, M. E. (1995). Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5'- phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **177**, 883–891.

2. PLP salvage pathway における PLP 前駆体 (PL: Pyridoxal、PM: Pyridoxamine、PN: Pyridoxine) 添加による増殖への影響評価

2.1 序

PLP (Pyridoxal-5'-phosphate, Vitamin B₆) は細胞増殖および代謝を支える極めて重要な補酵素である一方、4'位アルデヒド基に由来する高反応性化合物であり、140 反応以上の酵素反応に補酵素として機能する。従って、細胞内にて PLP が過剰に蓄積した際、様々な酵素活性に影響を与えられられる。過去の研究において、リジン残基特異的な Schiff 塩基形成能を PLP が示し活性中心近傍の立体構造の変化に寄与することから、酵素活性とタンパク質構造に焦点を当てた研究においては PLP が酵素の不活性化に用いられていた (Piszkiwicz et al., 1970; Rippa et al., 1967; Strausbaucht and Fischer, 1969)。これらの知見から、細胞内において PLP は適正濃度に維持されていると考えられる (John, 1995; Percudani and Peracchi, 2009)。実際に、DXP 依存 PLP 生合成経路における PNP および PMP oxidase PdxH、PLP サルベージ経路における PL、PM、PN kinase PdxK が、PLP によりフィードバック阻害を受けること (Ghatge et al., 2012; Roseann and Walter, 1970; Zhao and Winkler, 1995)、および、動物細胞や微生物が PLP phosphatase 活性を示すことから、PLP の生合成・分解両方の活性制御により、PLP の恒常性が維持されることが重要と考えられる (Fonda, 1992; Yang et al., 1998)。

PLP 欠乏に関する研究は、細菌だけでなく動物細胞においても行われ、多くの知見が蓄積されている (Gospe, 2009; Musayev et al., 2009; Oka et al., 1993)。一方で、PLP 蓄積に関する研究は行われておらず、主に PLP-酵素間相互作用に関する知見の蓄積が進められてきたに留まる (John, 1995)。近年、PLP 誘導体である PNP および PMP に関する恒常性維持機構に関して、それぞれ *Escherichia coli*、*Arabidopsis thaliana* を用いて研究が展開されたが、PLP 蓄積による生理的な影響に関しては未だ未解明である (Colinas et al., 2016; Prunetti et al., 2016)。

本章では、PLP 恒常性維持機構の一端を明らかにするために、PLP 蓄積条件の検討および細胞増殖への影響を明らかにし、未知である PLP 蓄積が細胞増殖に与える影響を捉えることを目的とした。

2.2 材料と方法

2.2.1 試薬類

本研究で使用した試薬類を本節で記すこととする。

純度 99.0% 以上の MOPS および Tricine は同仁化学研究所製を用いた。試薬特級 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 K_2HPO_4 、 H_3BO_3 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、メタノールおよびクロロホルムは和光純薬工業株式会社製を用いた。また、試薬一級 K_2SO_4 は和光純薬工業製を用いた。分子生物学用 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ も同様に和光純薬工業株式会社製を用いた。試薬特級 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ はナカライテスク株式会社製を用いた。超純水は、MERC MILLIPORE 社 Q-POD を用いて取水した。純度 99% 以上のピリドキサル塩酸塩、ピリドキシン塩酸塩、ピリドキサミンニ塩酸塩およびピリドキサル-5'リン酸水和物は SIGMA-ALDRICH 製を用いた

2.2.2 使用菌株

本研究では、大腸菌野生株 BW25113 株 ($\text{W3110 } lacI^q \text{ } rrrnBT14 \Delta lacZWJ16 \text{ } hsdR514 \Delta araBAD_{AH33} \Delta rhaBAD_{LD78}$) および *recA1* 変異株 (BW25141 株; $\text{W3110 } lacI^q \text{ } rrrnB3 \Delta lacZ4787 \text{ } hsdR514 \Delta (araBAD)567 \Delta (rhaBAD)568 \Delta phoBR580 \text{ } rph-1 \text{ } galU95 \Delta endA9 \text{ } uidA(\Delta MluI)::pir(wt) \text{ } recA1$) を利用した (Datsenko and Wanner, 2000; Haldimann and Wanner, 2001)。

2.2.3 実験方法

培養条件

Luria-Broth 寒天培地 (Bertani, 1951) にグリセロールストックの状態にある大腸菌野生株を画線培養し、30°Cに一晩置き静置培養を行い、コロニーを得た。そこで得た大腸菌野生株シングルコロニーを、0.2 % グルコース を炭素源とする MOPS 最少寒天培地 (Neidhardt et al., 1974) へと白金耳に画線培養し、30°C、一晩静置培養した。前培養液は、MOPS 最少寒天培地上に得た大腸菌野生株シングルコロニーを、3 mL の 0.2 % グルコース を炭素源とする MOPS 最少培地へと白金耳を用いて植菌し、150 rpm、30°C、24 時間振とう培養することで得た。本培養は、5 mL 同培地に 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌し、150 rpm、30°Cにて震とう培養し行った。増殖測定は、2 時間毎に $\lambda = 600 \text{ nm}$ における濁度 (OD_{600}) を OD-Monitor C & T instrument (TAITEC) を使用して測定した。

大腸菌培養液中への PL (Pyridoxine) / PM (Pyridoxamine) / PN (Pyridoxine) 添加

大腸菌野生株本培養の際に、超純水にて 500 mM になるよう調製し、MERC MILLIPORE 社 Millex-GV PVDF Filter (0.22 μm) で滅菌した各 B₆ vitamer (PL、PM、PN) を終濃度 1-3 mM になるよう培養液に添加した。

HPLC を利用した大腸菌細胞内における PLP (Pyridoxal-5'-phosphate) 濃度の測定

オートクレーブにて 120°C、20 分間滅菌処理を施した 300 mL 三角フラスコ内には、0.2 % グルコース を炭素源とする MOPS 最少培地を 100 mL 調整した。そこへ、同培地 3 mL にて前培養した大腸菌野生株 BW25113 を 500 分の 1 量植菌し、30°C、150 rpm で震とう培養を行った。細胞増殖は、DU640 SPECTROMETER (BECKMAN) にて OD_{600} を測定した。対数増殖期 ($\text{OD}_{600} = 0.5$) に達した際、500 mM PL を終濃度 2 mM になるよう添加し、1 時間後に MERC MILLIPORE 社製 Isopore Membrane HTP Filter (0.4 μm) を用いて菌体を回収した。菌体回収後速やかに超純水にて菌体を洗浄し、2 mL メタノールに菌体が吸着したフィルターを浸し、30 秒間 超音波洗浄機 (AS52GTU, ASONE) にて超音波処理を施し、10 分間静置し、細胞懸濁液を得た。10 分後、その 1.6

mL の細胞懸濁液に同量のクロロホルムおよび 640 μ L 超純水を添加し、ボルテックスにて再懸濁した。再懸濁液を 4°C、5 分間、4600 g にて遠心分離 (CF16RXII、HITACHI) し、水溶性画分を回収した。次に、HPLC assay with fluorescence detection kit (Immundiagnostik) 内の試薬を用いて、得られた水溶性画分からタンパク質等の高分子量化合物を除去し、蛍光検出するために誘導体化を行った。そのサンプルを用いて PLP の検出を行った (Excitation 320nm、Emission 415nm)。この際、Nexera X2 HPLC system (Shimadzu) および prontoSIL EuroBOND C-18 column (125 \times 0.4 mm, 0.5 μ m particle size; BISCHOFF CHROMATOGRAPHY) を使用した。移動相は、HPLC assay with fluorescence detection kit (Immundiagnostik) 内の移動相を利用した。

2.3 結果

2.3.1 HPLC による PLP 検量線作成および大腸菌における PLP 濃度定量

細胞内 PLP 濃度を測定するにあたり、まず PLP 濃度毎に HPLC 解析を行い、検量線を作成することとした。この際、PLP 標準品として和光純薬工業株式会社より PLP を購入し、細胞由来サンプルを解析する手順と同様の処理を行った（2.2.1.3 節参照）。

PLP 検量線作成の際に得られたクロマトグラムおよび検量線を図 15 に示す。保持時間が約 1.2 分および 5.2 分の位置に、それぞれピークが観察され、PLP 濃度に依存して著しく約 5.2 分の位置のピークが変動した（図 15 (A)）。HPLC assay with fluorescence detection kit (Immundiagnostik) によれば、約 5.2 分の保持時間に観察されるピークが PLP であるとしているため、このピークを用いて検量線を作成し、大腸菌野生株由来の PLP 定量に用いることとした（図 15 (B)）。

次に、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で大腸菌野生株を培養し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定し（図 22 (A)）、増殖相に応じた細胞内 PLP 濃度を定量した（図 16 (B)）。その結果、lag phase における細胞内 PLP 濃度は 4000 nmol 程度であったのに対し、log phase および stationary phase では、200 nmol 程度であった（図 16 (B)）。この結果から、大腸菌における細胞内 PLP 濃度は増殖相に依存して調節されることが示唆された。

2.3.2 PL/PM/PN 添加による増殖への影響評価

前節において、大腸菌は増殖相に応じて細胞内 PLP 量を調節することが示唆された。この結果から、細胞増殖を行うには PLP の生合成または分解を行うことで最適な PLP 濃度を維持する必要があると考えられる。PLP の欠乏は大腸菌において増殖阻害を引き起こすことが Dempsey らにより既に報告されているが、PLP 過剰蓄積が及ぼす生理的影響に関しては未だ知見が無い (Dempsey and Pachler, 1966)。そこで、本節では PLP 蓄積による細胞増殖への影響を観察することを目的とした。

細胞内 PLP 蓄積の影響を観察するためには、培養液中に PLP を添加し、その影響を観察することが簡便である。しかし、過去に行われた既往研究により、特異的なトランスポーターは発見されていないが、大腸菌は PL、PM、PN は取り込むことが可能であり、一方で、PLP は細胞内に取り込まれないことが示されている (Dempsey and Pachler, 1966)。そこで本研究では PL、PM、PN を終濃度 1-3 mM において培養液中に添加した際の大腸菌野生株の増殖を測定し、細胞増殖への影響を観察した (図 17 (A), (B) および 図 18)。その結果、PM および PN の添加は、大腸菌野生株の増殖に影響を与えなかった (図 17 (A) および (B))。その一方で、PL の添加は、濃度依存的な増殖開始の遅延を引き起こし、増殖開始以降の増殖速度に関しては影響を与えなかった。さらに、3 mM 以上の PL 添加の際には増殖は観察されなかった (図 18)。

2.3.3 PL 添加による細胞内 PLP 濃度の変化

2.3.2 節で PL 添加時のみ増殖開始が遅延する表現型が観察された（図 18 参照）。この表現型が、PLP 蓄積による由来するものか検証するために、HPLC 解析を行った。その結果、大腸菌野生株において 2 mM PL 添加し、1 時間培養した後は添加する前と比較して約 4 倍 PLP の蓄積が観察された（図 19）。これらの結果から、大腸菌野生株培養液中への PL 添加は PLP の蓄積を促進し、その結果増殖開始が遅延することが示唆された。

2.3.4 PL 添加による増殖開始阻害における遺伝子変異検証実験

なぜ PL 添加により増殖の開始が遅延されるのかを検証する一環として、2.5 mM PL を添加した 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で大腸菌野生株 (BW25113 株) および *recA1* 変異株 (BW25141 株) (Datsenko and Wanner, 2000; Haldimann and Wanner, 2001) の増殖曲線を測定した (1 次培養)。そして、OD₆₀₀ = 0.1 に達した培養液の上清を回収した。その上清に再度各大腸菌株の前培養液を 500 倍希釈して植菌し増殖測定を行った (2 次培養)。

その結果、1 次培養では大腸菌野生株および *recA1* 変異株 (BW25141 株) で PL 添加による増殖開始の遅延が観察された。その一方で、2 次培養ではその表現型は観察されなかった (図 20 (A) および (B))。このことから、何らかの PL 分解経路が存在することが考えられる。1 次培養において *recA1* 変異株培養液中における PL 添加により野生株同様の増殖開始の遅延が観察されたことから、PLP 過剰蓄積における増殖開始の阻害および再開は、遺伝子変異による起因するものではなく、何らかの細胞システムが阻害されたことによるものであることが示唆された (図 20 (B))。

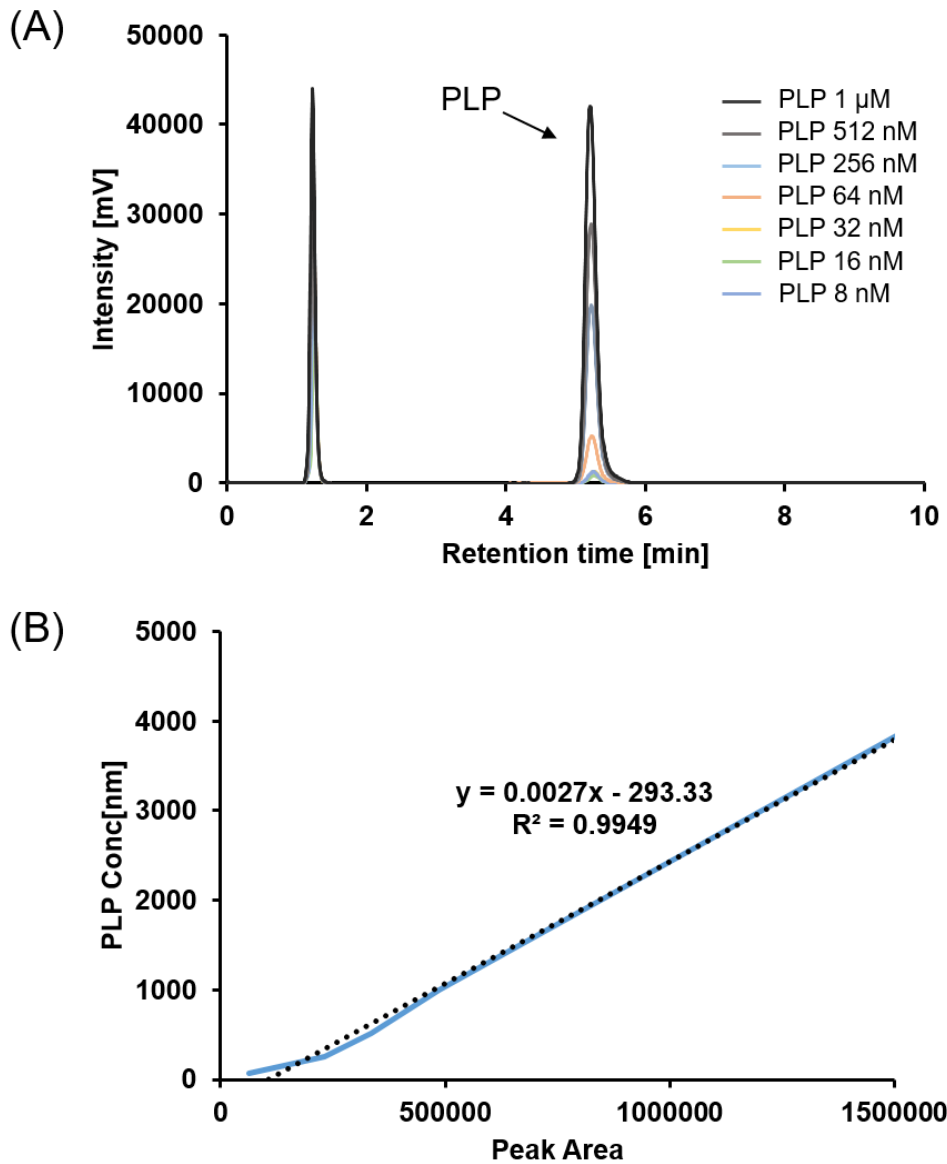


図 15 HPLC 解析により得られた PLP クロマトグラムおよび検量線

(A) PLP 標準試薬を 8 nM-4 μM の各濃度で HPLC を用いて解析した際のクロマトグラム、(B)クロマトグラムより作成した PLP 検量線（水色）。これから近似式（点線） y (PLP conc [nM]) = $0.0027 \times \text{Peak Area} - 293.33$ を算出し、大腸菌野生株から得た HPLC サンプル中の PLP 濃度を定量することとした。

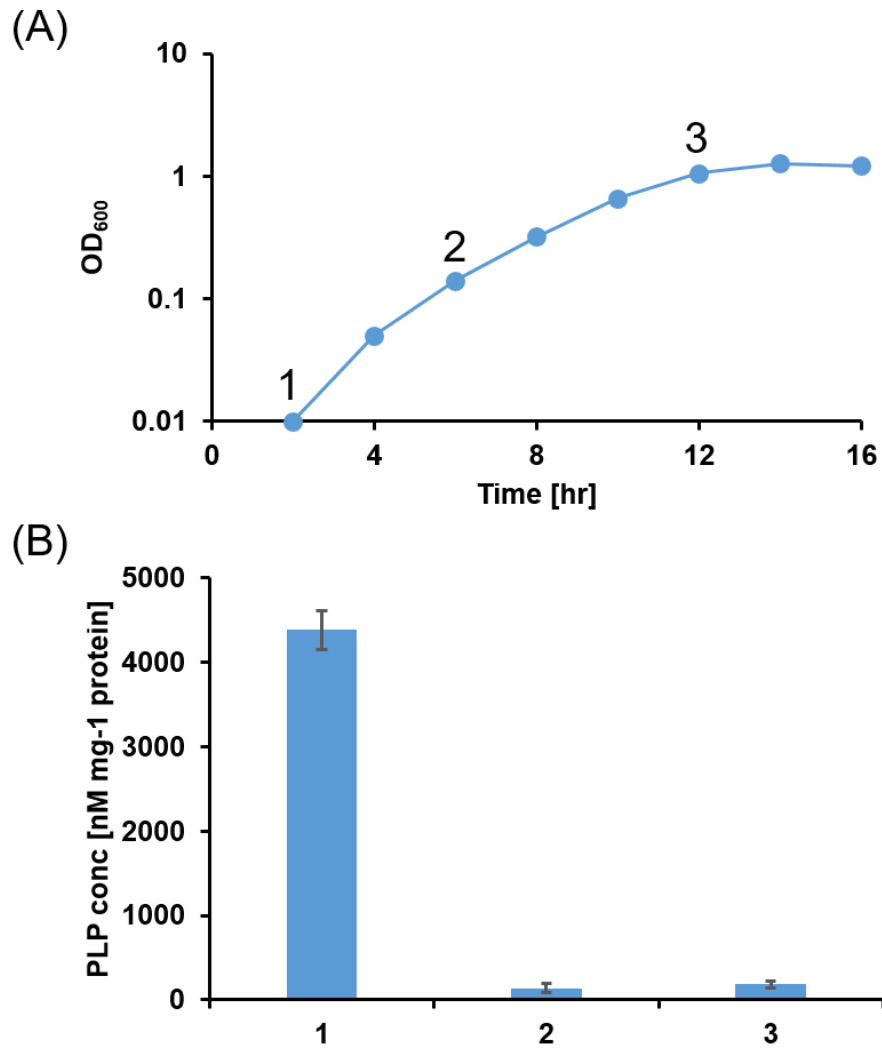


図 16 細胞内 PLP 濃度は増殖相に依存して変動する

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地における(A)大腸菌野生株増殖曲線および (B) PLP 濃度。30°C、150 rpm で培養し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。エラーバーは標準誤差を示す。増殖曲線中に示された数字 (1-3) および (B) 横軸は対応している。

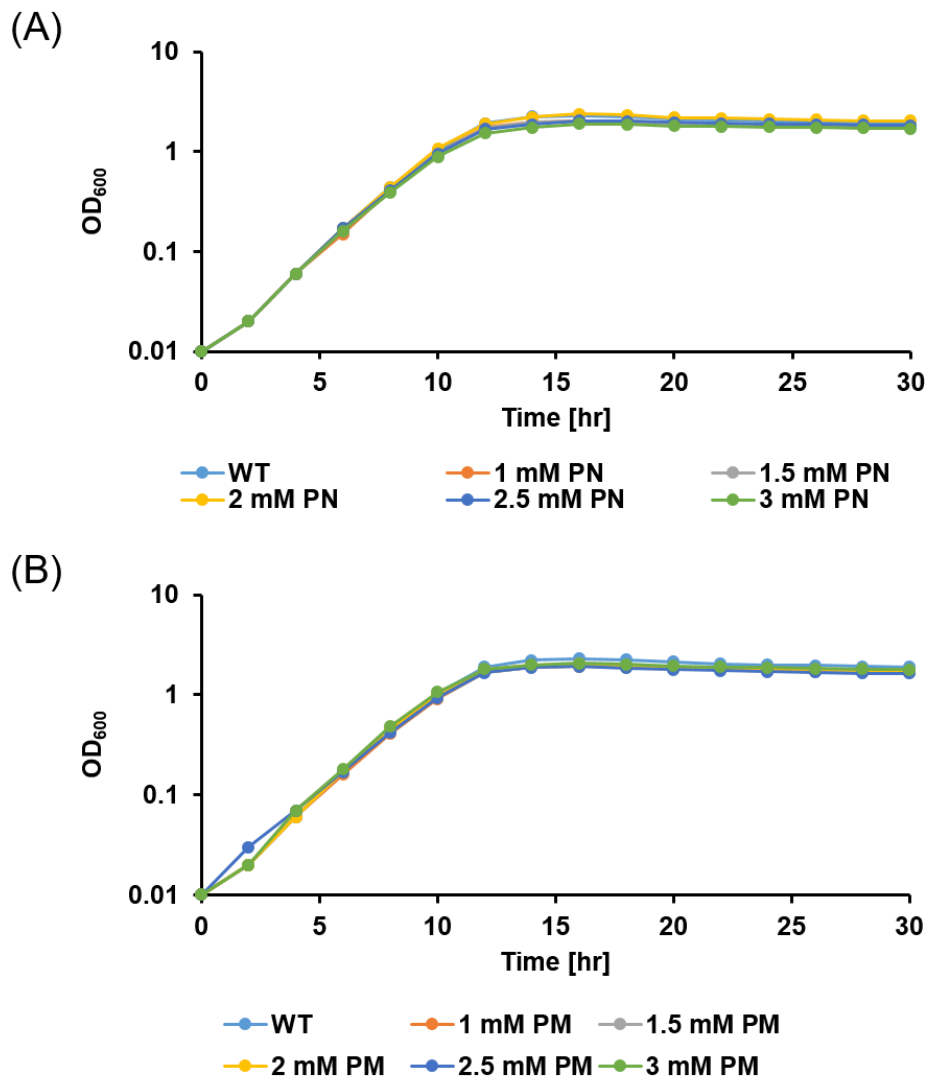


図 17 培養液中への Pyridoxine (PN) および Pyridoxamine (PM) 添加は大腸菌野生株 (BW25113 株、図中 WT) の増殖に影響を与えない

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌の培養に利用し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。(A) 培養液中への PN 添加、(B) 培養液中への PM 添加の際の大腸菌野生株の増殖曲線をそれぞれ示している。

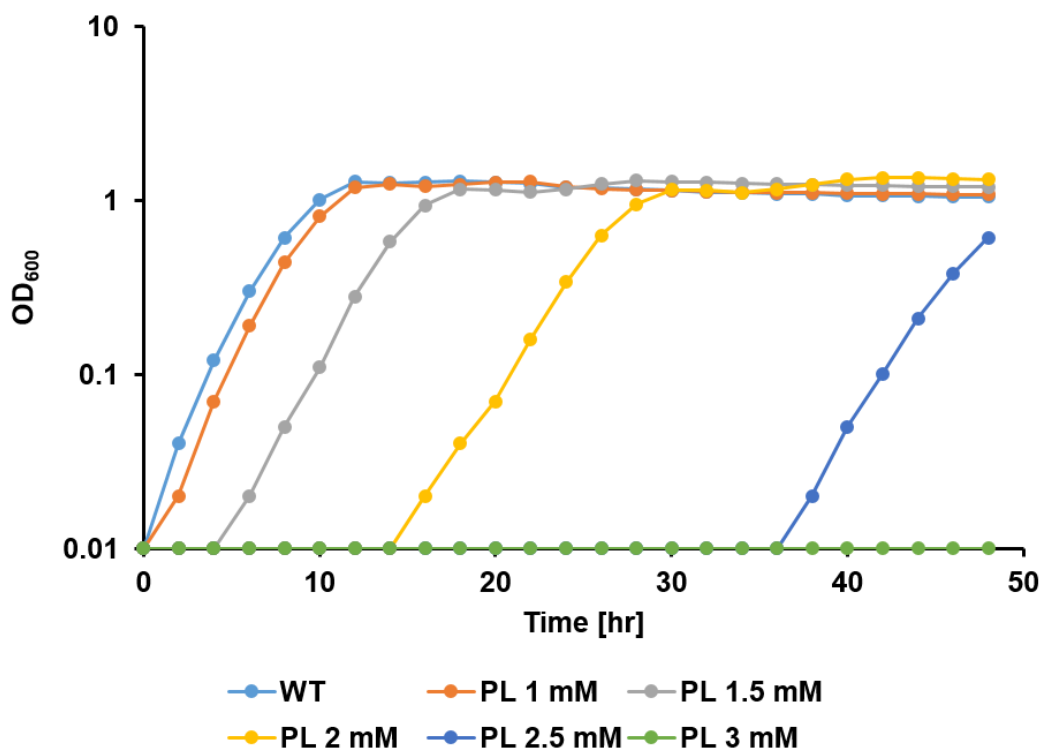


図 18 Pyridoxal (PL) の添加は、増殖開始を阻害する

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌の培養に利用し 30°C、150 rpm で振とう培養した。2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。図中に示す終濃度で PL を添加した際の大腸菌野生株の増殖への影響を示した。

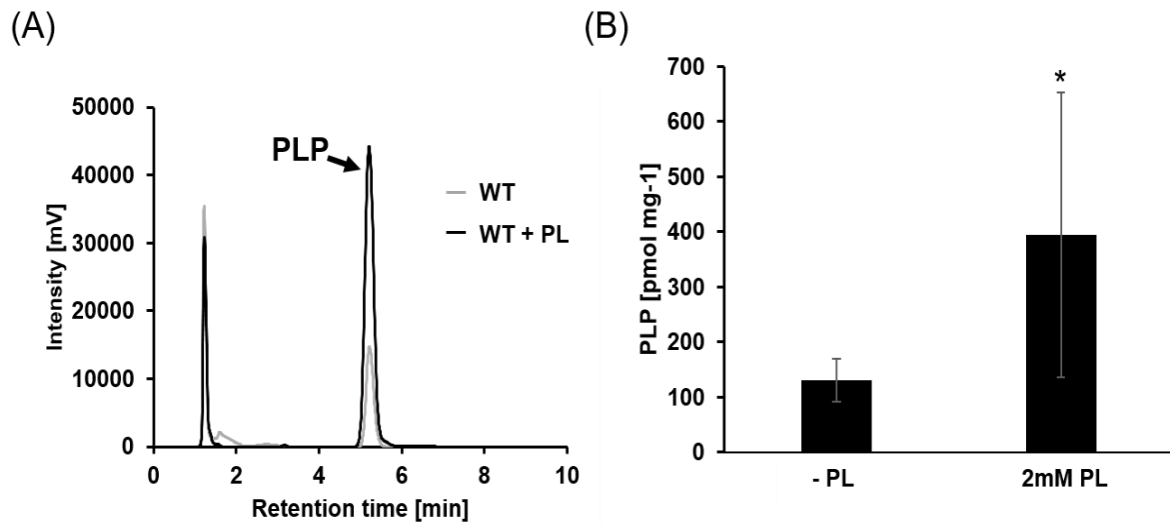


図 19 大腸菌野生株培養液中への PL 添加は、PLP の蓄積をもたらす

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌野生株の培養に利用し、2 時間毎に OD_{600} を測定した。log phase ($OD_{600}=0.5$) の培養液に終濃度 2 mM PL を添加し、1 時間後の培養液を回収、HPLC 解析により細胞内 PLP 濃度の定陵を行った。(A) HPLC クロマトグラム、(B) PLP 定量結果。* は student t 検定に基づく統計的な有意差を示す ($p < 0.1$)。

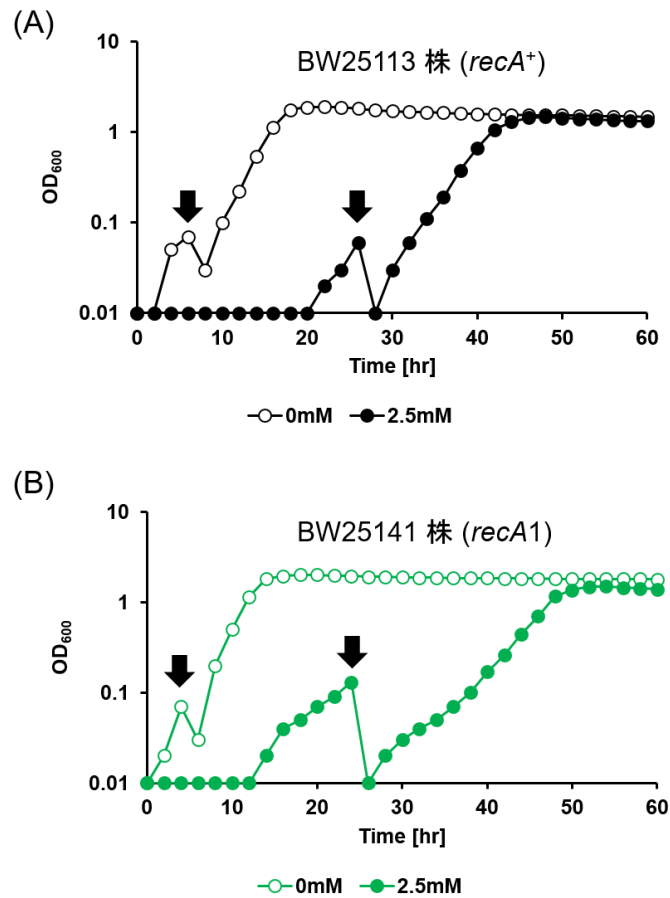


図 20 PL 添加後の増殖開始は、培養液中に添加した PL の不活性化に起因する (A) 大腸菌野生株 (BW25113 株) および (B) *recA1* 株 (BW25141 株) (Datsenko and Wanner, 2000; Haldimann and Wanner, 2001) を 2 mM PL を添加した MOPS 最少培地で培養し、 $OD_{600} = 0.1$ (黒矢印) の点で、培養液を回収、遠心分離して上清を回収した。その上清に各大腸菌株前培養液を植菌し増殖測定を行った。30°C、150 rpm の条件で振とう培養し、2 時間毎に OD_{600} を測定した。

2.4 考察

本章では、PLP 蓄積による細胞増殖への影響を検証することを目的に実験を行い、大腸菌野生株に PL を添加した際、約 4 倍の PLP の蓄積および増殖の開始特異的に増殖阻害が生じる現象を発見した (図 18 および図 19)。一方で、PM および PN の添加に対して大腸菌野生株は感受性を示さないことが明らかとなった (図 17)。PL は、PL、PM および PN kinase PdxK または PL kinase PdxY によるリン酸化により PLP へと変換される (Yang et al., 1998; Yang and Winkler, 1996)。また、PM および PN は、PdxK による PMP、PNP へのリン酸化反応および PMP、PNP oxidase PdxH による酸化反応の 2 反応により PLP へと変換される (Lam and Winkler, 1992; Yang et al., 1996)。前述のとおり、PdxK および PdxH は PLP によるフィードバック阻害を受けるため、PM および PN に対して感受性を示さなかったと考えられる。

PL および PLP は、リン酸基の有無による違いがあるのみで両化合物共に、その 4'位にアルデヒド基を持っている (図 13)。従って、培養液中へ過剰に添加された PL によるタンパク質および代謝産物に対する非特異的な相互作用が考えられる。しかし、pH が中性の水溶液である場合、PL の 4'位アルデヒドは水和されることにより PLP と比較して反応性が著しく低いことが明らかとなっている (Ahrens et al., 1977; Peterson and Sober, 1954)。従って、今回観察された PL 添加による細胞増殖開始の遅延は PLP 蓄積による表現型であると考えられる。今回の結果を受け、本章以降の章において PLP 蓄積条件下での大腸菌培養の際は、PL を添加することとした。

参考文献

Ahrens, M. L., Maas, G., Schuster, P., and Winkler, H. (1977). Kinetic Study of the Hydration Mechanism of Vitamin B₆, and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **21**, 6134–6139.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **62**, 293–300.

Colinas, M., Eisenhut, M., Tohge, T., Pesquera, M., Fernie, A. R., Weber, A. P. M., and Fitzpatrick, T. B. (2016). Balancing of B₆ vitamers is essential for plant development and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **28**, 1–15.

Dempsey, W. B., and Pachler, P. F. (1966). Isolation and characterization of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **91**, 642–645.

Fonda, M. L. (1992). Purification and characterization of vitamin B₆-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15978–15983.

Ghatge, M. S., Contestabile, R., di Salvo, M. L., Desai, J. V., Gandhi, A. K., Camara, C. M., Florio, R., González, I. N., Parroni, A., Schirch, V., and Safo, M. K. (2012). Pyridoxal 5'-Phosphate is a Slow Tight Binding Inhibitor of *E. coli* Pyridoxal Kinase. *PLoS One*, **7**, 16–19.

Gospe, S. M. (2009). Neonatal vitamin-responsive epileptic encephalopathies. *Chang Gung Med. J.*, **33**, 1–12.

Haldimann, A., and Wanner, B. L. (2001). Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria. *J. Bacteriol.*, **183**, 6384-6393.

Hisao, O., and Claudio, G. (1981). Structure-function Relationship in *Escherichia coli* Initiation Factors. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4905–4912.

John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1248**, 81–96.

Lam, H. M., and Winkler, M. E. (1992). Characterization of the complex *pdxH-tyrS* operon of *Escherichia coli* K-12 and pleiotropic phenotypes caused by *pdxH* insertion mutations. *J. Bacteriol.*, **174**, 6033–6045.

Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Saavedra, M. A., Contestabile, R., Ghatge, M. S., Haynes, A., Schrich, V., and Safo, M. K. (2009). Molecular basis of reduced pyridoxine 5'-phosphate oxidase catalytic activity in neonatal epileptic encephalopathy disorder. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30949–30956.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria Culture Medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736–747.

Oka, T., Komori, N., Kuwahata, M., Sassa, T., Suzuki, I., Okada, M., and Natori, Y. (1993). Vitamin B₆ deficiency causes activation of RNA polymerase and general enhancement of gene expression in rat liver. *FEBS Lett.*, **331**, 162–164.

Percudani, R., and Peracchi, A. (2009). The B₆ database: a tool for the description and classification of vitamin B₆-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*, **10**, 273.

Peterson, E. A., and Sober, H. A. (1954). Preparation of Crystalline Phosphorylated Derivatives of Vitamin B₆. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 169–175.

Piszkiewicz, D., Landon, M., and Smith, E. (1970). Bovine liver glutamate dehydrogenase SEQUENCE OF A HEXADECAPETIDE CONTAINING A LYSYL RESIDUE REACTIVE WITH PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2622–2626.

Prunetti, L., El Yacoubi, B., Schiavon, C. R., Kirkpatrick, E., Huang, L., Bailly, M., El Badawi-Sidhu, M., Harrison, K., Gregory, J. F., Fiehn, O., Hanson, A. D., and De Crécy-Lagard, V. (2016). Evidence that COG0325 proteins are involved in PLP homeostasis. *Microbiol.*, **162**, 694–706.

Rippa, M., Spanio, L., and Pontremoli, S. (1967). A Specific Interaction of Pyridoxal 5'-Phosphate and 6-Phosphogluconic Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 48–57.

Roseann, S. W., and Walter, B. D. (1970). Purification and Properties of Vitamin B₆ Kinase from *Escherichia coli* B. *Biochemistry*, **9**, 4057–4064.

Strausbaucht, P. H., and Fischer, E. H. (1969). Structure of the Binding Site of Pyridoxal 5'-Phosphate to *Escherichia coli* Glutamate Decarboxylase. *Biochemistry*, **9**, 233–238.

Yang, Y., Tsui, H. T., Man, T., and Winkler, M. E. (1998). Identification and Function of the *pdxY* Gene, Which Encodes a Novel Pyridoxal Kinase Involved in the Salvage Pathway of Pyridoxal 5'-Phosphate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1814–1821.

Yang, Y., Zhao, G., and Winkler, M. E. (1996). Identification of the *pdxK* gene that encodes pyridoxine (vitamin B₆) kinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 89–95.

Zhao, G., and Winkler, M. E. (1995). Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **177**, 883–891.

3. 大腸菌において PLP phosphatase 活性を示す YbhA、Cof、YigL の過剰発現および遺伝子欠損株を用いた PLP 蓄積の際の増殖評価によるスクリーニング

3.1 序

前節において、大腸菌は細胞増殖の過程で細胞内 PLP 濃度を制御すること、および、培養液中への PL 添加による PLP の蓄積が細胞増殖の開始を阻害することが明らかとなった (図 16、図 18 および図 19)。さらに、*recA1* 株においても野生株同様に PL 添加による増殖開始の阻害が観察された (図 20)。従って、細胞内における PLP の蓄積は様々な酵素の不活性化、および、代謝産物への相互作用をもたらし、細胞増殖の開始に影響を及ぼしたと考えられる。

細胞内 PLP 濃度は適切な濃度に維持される必要があり、その機構に関して様々な研究が実施され知見の蓄積が進められてきた。その成果の一つとして、大腸菌をモデル生物とした研究からは PLP による PL/PM/PN kinase PdxK、PMP/PNP oxidase PdxH のフィードバック阻害による酵素活性の制御が報告されている (Ghatge et al., 2012; White and Dempsey, 1970; Zhao and Winkler, 1995)。動物細胞を対象とした研究からは、PLP 脱リン酸酵素が発見された (Fonda, 1992; Gao and Fonda, 1994)。これら既往研究から、PLP の恒常性は生合成の制御だけではなく、自発的に脱リン酸化することによる PLP の不活性化の 2 つの機構により維持されていると考えられる。PLP 脱リン酸化活性は、大腸菌溶菌液からも見つけていたが、同定はされていなかった (Yang et al., 1998)。

近年、大腸菌ゲノムの解析が進められ、少なくとも 1186 の酵素が代謝に関与し、代謝産物は 1005 種にも及ぶことが報告されている (Keseler et al., 2005)。PLP を始めとするリン酸化代謝産物は生理学的に重要であることから、それに関連する遺伝子および酵素の同定が行われ、知見が蓄積されてきた。その一つとして、Haloacid dehalogenase (HAD) -like phosphatase と呼ばれるタンパク質ファミリーの存在が明らかとなった (Koonin and Tatusov, 1994)。既往研究によれば、HAD-like phosphatase family は細菌・古細菌・

真核細胞に広く保存されていることが明らかとされているが、このタンパク質ファミリーに属する多くの酵素に関して、生化学および生理学的な機能は明らかにされていなかった (Koonin and Tatusov, 1994)。近年、大腸菌に保存されている可溶性 HAD-like phosphatase に関して、それらの酵素の基質特異性を解明するための研究が *in vitro* 系を用いたスクリーニングにより行われた (Kuznetsova et al., 2006)。その結果、YbhA、Cof、そして YigL の 3 酵素が PLP 脱リン酸化活性を示すことが明らかになった。さらにこれらの酵素は、PLP だけではなく、様々なリン酸化代謝産物に対して脱リン酸化能を示すことも明らかとなった (Kuznetsova et al., 2006)。しかし、これら酵素の細胞内における機能は明らかにされておらず、細胞内で PLP 脱リン酸化酵素として機能するかは未知である。

本博士論文 1 章で、糖新生を触媒する fructose-1,6-bisphosphatase にアノテーションされた Isozyme の解析を行った際、YbhA 過剰生産株において著しい増殖阻害が生じ、その表現型が PL、PM および PN の添加により抑圧されることが明らかとなったことから、YbhA の生理機能は PLP phosphatase であることが示唆された (図 12)。そこで、本節では YbhA だけでなく、Cof および YigL を対象として細胞内で PLP 蓄積に対する寄与を明らかにし、生理的に PLP 特異的脱リン酸化酵素の同定を目的とした。

3.2 材料と方法

3.2.1 試薬類

本研究で使用した試薬類を本節で記すこととする。

純度 99.0% 以上の MOPS および Tricine は同仁化学研究所製を用いた。試薬特級 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 K_2HPO_4 、 H_3BO_3 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、メタノール、クロロホルムは和光純薬工業株式会社製を用いた。また、試薬一級 K_2SO_4 は和光純薬工業製を用いた。分子生物学用 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ も同様に和光純薬工業株式会社製を用いた。試薬特級 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ はナカライテスク株式会社製を用いた。超純水は、MERC MILLIPORE 社 Q-POD を用いて取水した。純度 99% 以上のピリドキサル塩酸塩は SIGMA-ALDRICH 製を用いた。

3.2.2 使用菌株およびプラスミド

本研究で使用した大腸菌株、および、プラスミドをそれぞれ表 3.1、表 3.2 に示す。

P1 ファージ形質導入法による *ybhA* 復帰株 (*ybhA*⁺) 株作成手順

pCP20 (Amp^R 遺伝子保持) で形質転換した大腸菌野生株 BW25113 の培地には 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin を添加した。また、Keio collection (Baba et al., 2006) の大腸菌株においては 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin を添加した培地を使用した。

$\Delta ybhA$ 株から Km^R 遺伝子を除去するために、pCP20 プラスミドで形質転換した形質転換体を LB 寒天培地上で選択し、3 mL 同培地で前培養した。さらに、前培養液から 500 分の 1 量を取り、本培養は 3 mL LB 培地へと植菌、42°C、6 時間振とう培養した (Baba et al., 2006; Cherepanov and Wackernagel, 1995)。その培養液を、LB 寒天培地

に塗布、37°C で静置培養を行った。得られたコロニーを、さらに LB+Ampicilin+Kanamycin 寒天培地上で生育できないことを確認し、pCP20 plamisd および Km^R 遺伝子の除去に成功したか検証を行った。Ampicilin および Kanamycin 感受性株を、Gotaq Green Master Mix (Promega) を用いたコロニー PCR にて *ybhA::null* となっていることを確認、 $\Delta ybhA$ -null 変異株とした。

ybhA 復帰株 (*ybhA*⁺株) は、P1 ファージを利用した形質導入法にて作成した。その際、宿主株として先述した $\Delta ybhA$ -null 変異株を用いた。*ybhA* 遺伝子座に近接し、遺伝子欠損によって表現型を示さなかった $\Delta ybhD$ (*ybhD::Km^R*) 株を *ybhA* 遺伝子ドナー株として利用した。本株も $\Delta ybhA$ 株同様に Keio コレクションから得た。*ybhA*⁺ 株の選択は、LB+Kanamycin 寒天培地上で行い、コロニー PCR にて株の確認を行った (図 21)。

λ red を用いた Recombieering による *ybhA*-his 株作成手順

ybhA-His 株は pKD46 プラスミド上から発現する λ ファージ由来組み換え酵素を利用して作成した (Datsenko and Wanner, 2000)。pRSH-*ybhA* プラスミドを鋳型にし、*ybhA*_reF および *ybhA*_reR プライマーセットで、*ybhA* 遺伝子 C 末端領域に 6 × His tag を付加した配列、および、その下流に spectinomycin 耐性遺伝子を配した dsDNA 断片を増幅した。pKD46 プラスミドを形質転換した大腸菌野生株 (BW25113 株) を 30°C、130 rpm で振とう培養した 3 mL LB + Ampicillin 培地上で本形質転換株を培養した。OD₆₀₀=0.3-0.4 に達した培養液に 0.2% arabinose を添加し、30 分間同条件にて培養した。培養液全容量を用いて、エレクトロポレーション用コンピテントセルを調製した。50 μL コンピテントセルに 250 μg の PCR で増幅した dsDNA を混ぜ、1 mm gap cuvette にてエレクトロポレーション (1.8 kV, 25 μF, 200 Ω) した。すぐに 氷冷した 3 mL SOC 培地を加え、30°C、130 rpm で out growth を 2 時間行った。培養液 100 μL を 40 μg mL⁻¹

¹ spectinomycin を含む LB 寒天培地上で組み換え体の選択を行った。概要図を図 22 に示す。

3.2.3 使用したプライマー

本研究で使用したプライマーを表 3.3 に示す。

表 3.1 大腸菌株リスト

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	Source
BW25113	W3110 <i>lacI^q rrnBT14 ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78</i>	Keio collection*
<i>ΔybhA</i>	BW25113 <i>ybhA::Km^R</i>	Keio collection
<i>Δcof</i>	BW25113 <i>cof::Km^R</i>	Keio collection
<i>ΔyigL</i>	BW25113 <i>yigL::Km^R</i>	Keio collection
<i>ΔybhA</i> -null	BW25113 <i>ybhA::null</i>	This study
<i>ybhA⁺</i>	<i>ybhA</i> -null <i>ybhA⁺ ybhD::Km^R</i>	This study
<i>ybhA</i> -His	BW25113 <i>ybhA</i> -6xHis- Spec ^R T7ter-	This study

* (Baba et al., 2006)

表 3.2 プラスミドリスト

Plasmid	Source
pCA24N Δ <i>gfp</i>	ASKA library**
pCA24N Δ <i>gfp-ybhA</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-cof</i>	ASKA library
pCA24N Δ <i>gfp-yigL</i>	ASKA library
pCP20	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pRSH- <i>ybhA</i>	This study
pKD46	(Datsenko and Wanner, 2000)

** (Kitagawa et al., 2005)

表 3.3 プライマーリスト

Primer Name	Sequence (5' to 3')
<i>ybhA</i> _F	GTGGTATCGGTGTACCATTC
<i>ybhA</i> _R	AAGTGTGTCGATAACCGCCT
<i>ybhD</i> _F	GGTTACATTAAGGGCAAAGC
<i>ybhD</i> _R	AGGGACCAATGTGGGTGGTG
Kan_F	GGCTATGACTGGGCACAACA
Kan_R	GGCGATACCGTAGAGCACG
<i>ybhA</i> _reF	CATGAACTGGGACTGGAGTGTGAAT

ybhA_reR

TCAAGGCGCCTTGAATGCTCGCTGTACGCGCAAATTAAGT
GTGTCGATAACCGCCTG

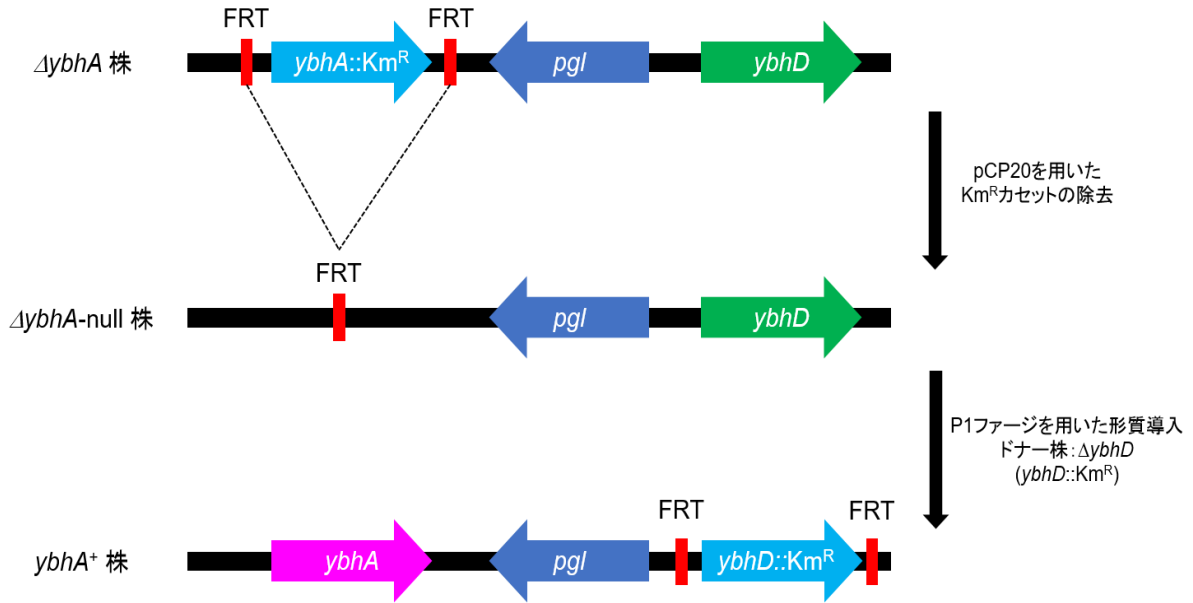


図 21 各変異株取得概要図

ΔybhA 株は *ybhA* 遺伝子座に Kanamycin 耐性遺伝子が置換される形式で欠損株となっている。本株は、Kanamycin 耐性遺伝子上流および下流に FLP recognition target (FRT) 領域が配置されている (Baba et al., 2006)。*ΔybhA*-null 株を得るために、*ΔybhA* 株に pCP20 プラスミドを形質転換し、本 plamid から FLP 組み換え酵素を発現させることで FRT 領域の相同組み換えを行い Kanamycin 耐性遺伝子の欠失を行った。さらに、得られた *ΔybhA*-null 株を宿主株とし、*ΔybhD* 株に感染させた P1 ファージを用いて形質導入を行い、*ybhA* 復帰株 (*ybhA*⁺株) を得た。

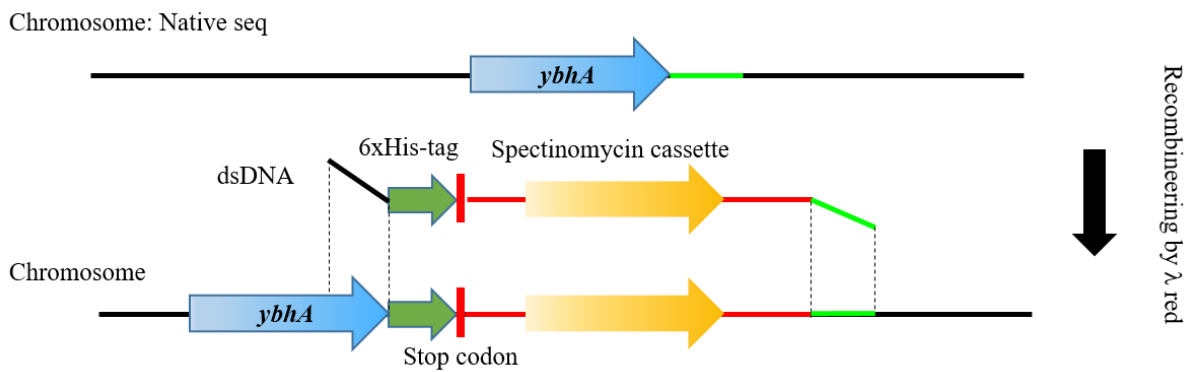


図 22 *ybhA*-His 株作成概要図

pKD46 で形質転換した大腸菌野生株 (BW25113 株) を始祖とし、0.2% arabinose を培養液中に添加し、 λ ファージ由来組み換え酵素 (図中 λ red) の発現を誘導した。その株に PCR で増幅した dsDNA (*ybhA*-6 × His tag-spectinomycin 耐性遺伝子-T7ter) をエレクトロポレーションにて導入した。

3.2.4 実験方法

各 *ybhA/cof/yigL* 遺伝子過剰発現株を用いた増殖曲線測定

pCA24N Δ *gfp* vector 形質転換体の選択には 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol 含有培地を用いた。

LB 寒天培地 (Bertani, 1951) 上で pCA24N Δ *gfp*-empty、pCA24N Δ *gfp*-*ybhA*、pCA24N Δ *gfp*-*cof*、pCA24N Δ *gfp*-*yigL* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株 (BW25113 株) をそれぞれ選択した。得られた各形質転換体シングルコロニーを、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地 (Neidhardt, Bloch, and Smith, 1974) へと白金耳に画線培養し、30°C、一晚静置培養した。前培養液は、MOPS 最少寒天培地上に生えた各形質転換体のシングルコロニーを、3 mL の 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地へと白金耳を用いて植菌し、150 rpm、30°C、24 時間振とう培養することで得た。本培養は、500 μM IPTG を添加した 5 mL の同培地に 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌し、150 rpm、30°C にて震とう培養することで行った。増殖測定は、2 時間毎に $\lambda = 600 \text{ nm}$ における濁度 (OD_{600}) を OD-Monitor C & T instrument (TAITEC) を使用して測定した。

YbhA 過剰発現株の PL/PM/PN 添加に対する感受性評価

pCA24N Δ *gfp* vector 形質転換体の選択には 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol 含有培地を用いた。

LB 寒天培地 (Bertani, 1951) 上で pCA24N Δ *gfp*-empty、pCA24N Δ *gfp*-*ybhA* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株 (BW25113 株) をそれぞれ選択した。得られた各形質転換体シングルコロニーを、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地 (Neidhardt et al., 1974) へと白金耳に画線培養し、30°C、一晚静置培養した。前培養液は、MOPS 最少寒天培地上に生えた各形質転換体のシングルコロニーを、3 mL の 0.2%

グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地へと白金耳を用いて植菌し、150 rpm、30°C、24 時間振とう培養することで得た。本培養は、2 mM PL および 0-75 μ M IPTG を添加した 5 mL 同培地に 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌し、150 rpm、30°C にて震とう培養することで行った。増殖測定は、2 時間毎に $\lambda = 600$ nm における濁度 (OD₆₀₀) を OD-Monitor C & T instrument (TAITEC) を使用して測定した。

大腸菌野生株 BW25113 および $\Delta ybhA$ 株を用いた細胞内 PLP 濃度定量のための HPLC 解析

オートクレーブにて 120°C、20 分間滅菌処理を施した 300 mL 三角フラスコ内に、0.2% グルコース を炭素源とする MOPS 最少培地を 100 mL 調整した。そこへ、同培地 3 mL にて前培養した大腸菌野生株および $\Delta ybhA$ 株を 500 分の 1 量植菌し、30°C、150 rpm で震とう培養を行った。細胞増殖は、DU640 SPECTROMENTER (BECKMAN) にて OD₆₀₀ を測定した。対数増殖期 (OD₆₀₀ = 0.5) に達した際、500 mM PL を終濃度 2 mM になるよう添加し、1 時間後に MERC MILLIPORE 社製 Isopore Membrane HTTP Filter (0.4 μ m) を用いて菌体を回収した。菌体回収後速やかに超純水にて菌体を洗浄し、2 mL メタノールに菌体が吸着したフィルターを浸し、30 秒間 超音波洗浄機 (AS52GTU, ASONE) にて超音波処理を施し、10 分間静置し、細胞懸濁液を得た。10 分後、その 1.6 mL の細胞懸濁液に同量のクロロホルムおよび 640 μ L 超純水を添加し、ボルテックスにて再懸濁した。再懸濁液を 4°C、5 分間、4600 g にて遠心分離 (CF16RXII, HITACHI) し、水溶性画分を回収した。次に、HPLC assay with fluorescence detection kit (Immundiagnostik) 内の試薬を用いて、得られた水溶性画分からタンパク質等の高分子量化合物を除去し、蛍光検出するために誘導體化を行った。そのサンプルを用いて PLP の検出を行った (Excitation 320nm、Emission 415nm)。この際、Nexera X2 HPLC system (Shimadzu) および prontoSIL EuroBOND C-18 column (125 \times 0.4 mm, 0.5

μm particle size; BISCHOFF CHROMATOGRAPHY) を使用した。移動相は、HPLC assay with fluorescence detection kit (Immundiagnostik) 内を利用した。

各遺伝子欠損株における Pyridoxal kinase PdxK および PdxY 過剰発現による増殖への影響評価

大腸菌野生株 BW25113 および $\Delta ybhA$ 、 Δcof 、 $\Delta yigL$ 各遺伝子欠損株、 $ybhA^+$ 株を、pCA24N Δgfp -empty、pCA24N Δgfp -pdxK、pCA24N Δgfp -pdxY で形質転換し、LB 寒天培地上で形質転換体の選択を行った。その後、得られた各形質転換体シングルコロニーを、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地 (Neidhardt et al., 1974) へと白金耳に画線培養し、30°C、一晩静置培養した。各形質転換体シングルコロニーを、500 μM IPTG を含む MOPS 最少寒天培地へ、白金耳で画線し 30°C で 24 時間静置培養した後、各寒天培地の写真を FAS-IV (NIPPON Genetics) で撮影した。

YbhA および既知、または、PLP phosphatase と予測されるアミノ酸配列相同性の評価

NCBI より各生物種の PLP phosphatase のアミノ酸配列を取得した。取得したアミノ酸配列は、ClustalW (McWilliam et al., 2013) によりアライメントを行った。

3.3 結果

3.3.1 各 *ybhA/cof/yigL* 遺伝子過剰発現株を用いた増殖曲線測定

in vitro 系で PLP 脱リン酸化能を示すことが報告されている YbhA、Cof および YigL の過剰発現により、前節で示唆された PLP 蓄積による増殖開始の遅延がこれら酵素の過剰発現で緩和されるか検証することで、PLP 蓄積に対する寄与を検証することにした。そこで、500 μ M IPTG および 2 mM PL を添加した 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で、これら酵素の過剰発現株の増殖測定を行った。その結果、コントロール株である pCA24N Δ *gfp*-empty、*cof* および *yigL* プラスミド形質転換体は、IPTG の有無に関わらず、PL の添加により増殖開始の遅延が観察された。その一方で YbhA 過剰発現株のみ PL 添加に対する感受性が著しく緩和されることが明らかになった (図 23(A))。

pCA24 Δ *gfp* プラスミドは、multi cloning site 上流に 6 \times His タグ配列を持ち、過剰発現させる遺伝子はその下流に位置するため、6 \times His タグ抗体によるタンパク質の検出が可能である (Kitagawa et al., 2005)。そこで、過剰発現した YbhA、Cof および YigL の発現量を Western blotting 法で検出し、Cof および YigL の発現量が不足したことで PLP phosphatase 活性が示されなかったのか検証を行った。その結果、YbhA、Cof、YigL の発現量は同程度であることが示された (図 23 (B))。タンパク質発現量は同程度あるにもかかわらず、YbhA のみ PL 添加による増殖開始の阻害を抑圧したことから、YbhA のみが PLP phosphatase として機能し、PLP 過剰蓄積を抑制することで恒常性維持に寄与することが示唆された。

3.3.2 YbhA 過剰発現株の PL 添加に対する感受性評価

PLP の欠乏は、細胞増殖に影響を及ぼすことが報告されている (Dempsey and Pachler, 1966)。前節で、YbhA が PLP 脱リン酸化酵素として示唆されたため、*ybhA* 遺伝子の過剰発現により PLP の脱リン酸化が触媒され、細胞増殖に影響が生じることが考えられた。そこで、0.2 % グルコース を炭素源とした MOPS 最少培地にて、0-500 μM IPTG 添加時における pCA24N Δ *gfp*-empty または pCA24N Δ *gfp*-*ybhA* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株の増殖を測定した。その結果、IPTG 濃度に依存して YbhA 過剰発現株の増殖速度の減少が観察された (図 24(A))。

YbhA の過剰発現により観察された増殖速度の低下が PLP 枯渇に起因すると仮定すると、増殖速度に依存して PLP 濃度が異なることが期待された。実際に、HPLC 解析により PLP 定量を行った際、IPTG を添加しなかった培養液においては、320 pmol mg^{-1} の PLP が細胞内に存在することが示された (図 24 (B)、4)。一方で、500 μM IPTG を添加した YbhA 過剰発現株では、増殖速度が 0.011 h^{-1} と著しく低く増殖が阻害されている状態では、細胞内 PLP 濃度は 約 54 pmol mg^{-1} であり、増殖再開後においては、約 310 pmol mg^{-1} であり、コントロール株と同程度の PLP 量 が確認された (図 24 (B) 1 および 3)。また、75 μM IPTG 添加時の YbhA 過剰発現株は増殖速度が 約 0.04 h^{-1} 程度であったが (図 24 (A))、その状態にあるときは 約 60 pmol mg^{-1} の PLP 濃度であることが示された (図 24 (B) 3)。

さらに、PL と同様に PdxK および PdxH により PLP へと変換される PM および PN の添加の際も YbhA 過剰発現の表現型が抑圧された (図 12(B))。これらの結果から、YbhA 過剰発現は PLP 脱リン酸化による PLP の欠乏を引き起こすことで、増殖速度の低下が生じることが示唆された。

3.3.3 YbhA および既知、または、PLP phosphatase と予測されるアミノ酸配列相同性の評価

Fonda によりヒト (*H. sapiens*) の赤血球から PLP phosphatase (hPLPP) が既に同定されている (Fonda, 1992)。さらに、Gao および Fonda により、活性中心が N 末端から 26 残基にある cysteine 残基が PLP phosphatase 活性に必須であることが示唆された (Gao and Fonda, 1994)。また、近年カイコ (*B. mori*) においても PLP phosphatase が同定された (Huang et al., 2017)。そこで、BLAST search から取得したヒトおよびカイコの PLP phosphatase のホモログとして考えられるアミノ酸配列を、ハツカネズミ (*M. musculus*)、ゼブラフィッシュ (*D. rerio*)、イースト (*S. cerevisiae*) を取得した。さらに細菌からは、*C. glutamicum*、*S. elongatus* PCC 7942 および PCC 6803 株からも hPLPP ホモログと予想されたアミノ酸配列を取得し、YbhA がこれら既知、または、予測される PLP phosphatase とどの程度相同性を示すか検証を行った。

その結果、真核生物 (ハツカネズミ、ゼブラフィッシュ、イースト、カイコ) においては、hPLPP のアミノ酸配列と比較して約 29-45% の相同性が確認され、さらに、活性中心として考えられる cysteine 残基も保存されていた (図 25)。

YbhA および *C. glutamicum*、*S. elongatus* から PLP phosphatase として予測されたアミノ酸配列においては、hPLPP と比較してそれぞれ 6% 程度の相同性を示した。さらに、hPLPP で活性中心と考えられる cysteine 残基が保存されていなかった (図 25)。

3.3.4 PLP 蓄積時の *ybhA* 遺伝子発現の影響

これまでに、YbhA が PLP phosphatase として生理活性を示すことが示唆された。そこで、細胞内 PLP 濃度の上昇がシグナルとなり *ybhA* 遺伝子の発現が制御されるか検証するために、PL 添加時における *ybhA* 遺伝子プロモーター活性および YbhA タンパク質量を LacZ レポーターアッセイおよび western blotting 解析を行った。

0.2 % グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で pRS551-*ybhA* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株を log phase ($OD_{600}=0.4$) まで培養し、10 μ M、1 mM、2 mM 各濃度の PL を培養液中に添加し、1 時間継続して培養した。その後、各培養液を回収し、 β -galactosidase 活性を測定した。その結果、どの濃度においても PL を添加しなかった培養液と比較して差が生じなかった (図 26 (A))。また、PLP 蓄積時における細胞内 YbhA 量を明らかにするため、ゲノム上の *ybhA* 遺伝子 C 末端に 6 \times His tag を挿入した *ybhA*-His 株を作成した。*ybhA*-His 株を同培地にて log phase ($OD_{600}=0.4$) まで培養し、2 mM PL、PN および PM を添加し、1 時間後の培養液を用いて western blotting 解析を行った。その結果、どの場合においても YbhA 量はコントロールと比較して同程度であった (図 26 (B))。これらの結果から、*ybhA* 遺伝子発現および 細胞内 YbhA 量は細胞内 PLP 量に依存しないことが明らかになった。

3.3.5 各遺伝子欠損株における Pyridoxal kinase PdxK および PdxY 過剰発現による増殖への影響評価

ybhA 遺伝子の生理的役割が PLP 脱リン酸化による PLP 蓄積の阻害であれば、 $\Delta ybhA$ 株では PL 添加により野生株 (BW25113 株) と比較して顕著な増殖阻害が観察されることが期待された。そのため、PL を 0-2.5 mM の各濃度で添加した際の野生株 (BW25113 株) および $\Delta ybhA$ 株の増殖を測定した。

野生株に 2.5 mM PL を添加すると増殖開始が約 35 時間にまで遅延するのに対し、 $\Delta ybhA$ 株では 2.5 mM PL 添加により増殖阻害が観察されるものの、増殖開始に関しては PL を添加していない野生株や $\Delta ybhA$ 株と比べて大きな違いは観察されなかった (図 27(A))。そこで、HPLC 解析により細胞内 PLP 濃度の定量実験を行った結果、野生株では、2 mM PL 添加により約 6 倍 PLP の蓄積が観察されたが、 $\Delta ybhA$ 株では PLP の蓄積が観察されなかった (図 27(B))。

次に、これまでに PLP 蓄積が細胞増殖開始の遅延を引き起こすことが示唆されていたことから (図 18)、PL/PM/PN kinase PdxK、PL kinase PdxY を過剰発現させ、PLP 蓄積状態を模倣した際に $\Delta ybhA$ 株の増殖に影響が生じるか検証することで、*ybhA* 遺伝子の PLP phosphatase としての生理的役割を確認することとした。そこで、500 μ M IPTG を含む 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地上で、pCA24N Δ *gfp-pdxK*、pCA24N Δ *gfp-pdxY* プラスミドで形質転換した野生株および $\Delta ybhA$ 株の増殖を観察した。その結果、野生株では PdxK、PdxY の過剰発現では増殖に影響が生じなかった (図 28 (A))。しかし、 $\Delta ybhA$ 株では PdxK の過剰発現によりほとんど生育できなくなり、PdxY 過剰発現ではコロニーが薄く、僅かではあるが増殖阻害が生じたことが示唆された (図 28 (B))。*ybhA* 復帰株 (*ybhA*⁺株) では、 $\Delta ybhA$ 株で観察されたこれらの表現型が消失し、野生株と同様の結果となった (図 28 (C))。また Δ *cof*、 Δ *yigL* 株に pCA24N Δ *gfp-pdxK*、pCA24N Δ *gfp-pdxY* プラスミドで形質転換し、同様の実験を行ったが $\Delta ybhA$ 株で示された増殖阻害は観察されず、野生株同様の結果となった (図 29)。

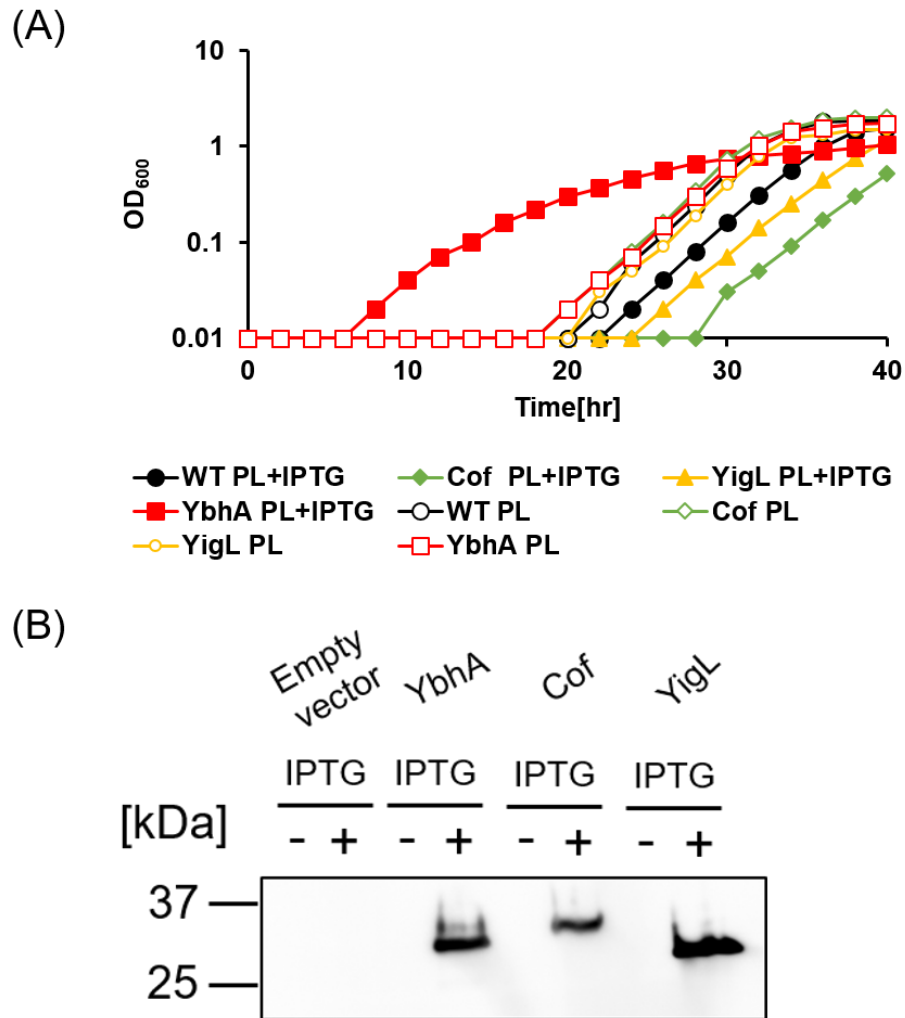


図 23 YbhA の過剰発現は、PL 添加による増殖開始遅延を緩和する
 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌の培養に利用し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。(A) PL は 2 mM、IPTG は 500 μ M の終濃度になるよう培養液中へ添加し、PL 添加に対する *ybhA*、*cof* および *yigL* 遺伝子過剰発現の影響を観察した。(B) pCA24N Δ *gfp*-empty、pCA24N Δ *gfp*-*ybhA*、pCA24N Δ *gfp*-*cof*、pCA24N Δ *gfp*-*yigL* プラスミドから発現させた各 PLP phosphatase を 6 \times His タグ抗体により検出した (Tanaka et al., 1993)。可溶性画分タンパク質 4 μ g を 12% gel 上で SDS-PAGE を行った。

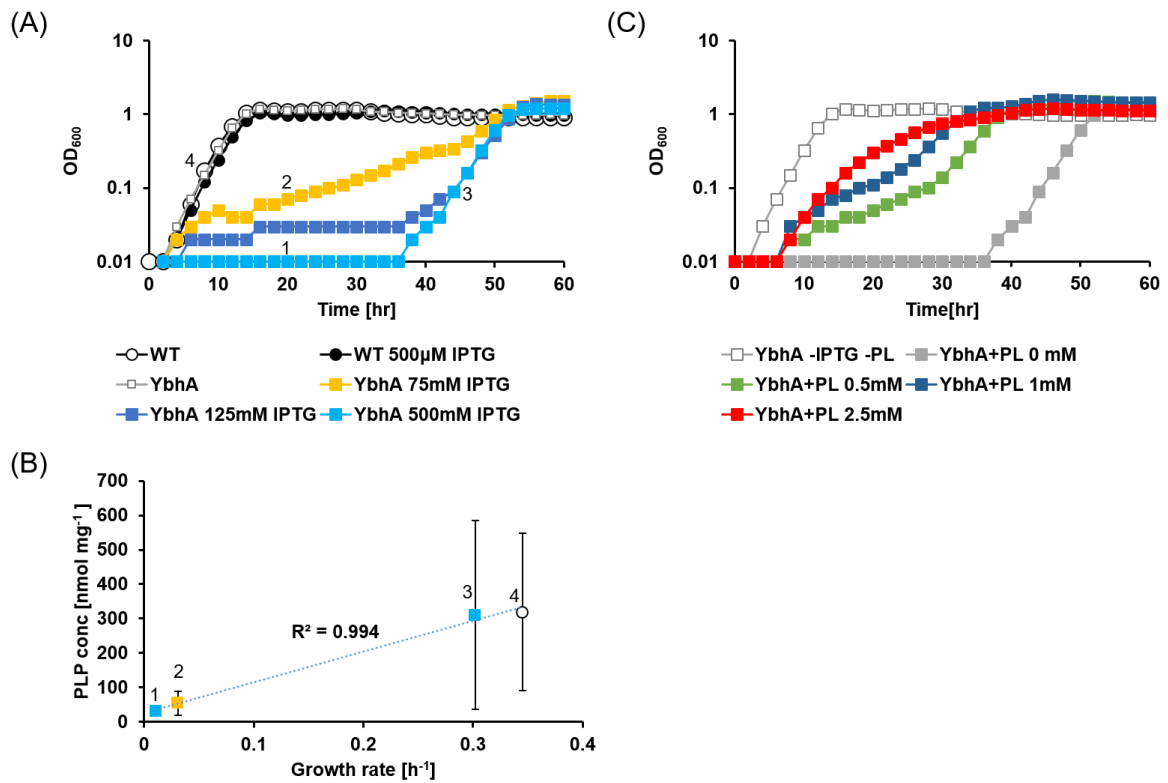


図 24 YbhA 過剰発現は、PLP の欠乏が引き起こすことで増殖速度の低下をもたらす。0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌の培養に利用し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。(A) 図中に示す各 IPTG 濃度添加時の pCA24NΔ*gfp*-empty (WT)、pCA24NΔ*gfp-ybhA* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株 (YbhA) の増殖曲線。(B) *ybhA* 遺伝子過剰発現株における細胞内 PLP 濃度。(C) pCA24NΔ*gfp-ybhA* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株培養液に各濃度の PL を添加した際の増殖曲線。*ybhA* 遺伝子過剰発現のために IPTG は終濃度 500 μM になるよう添加した。

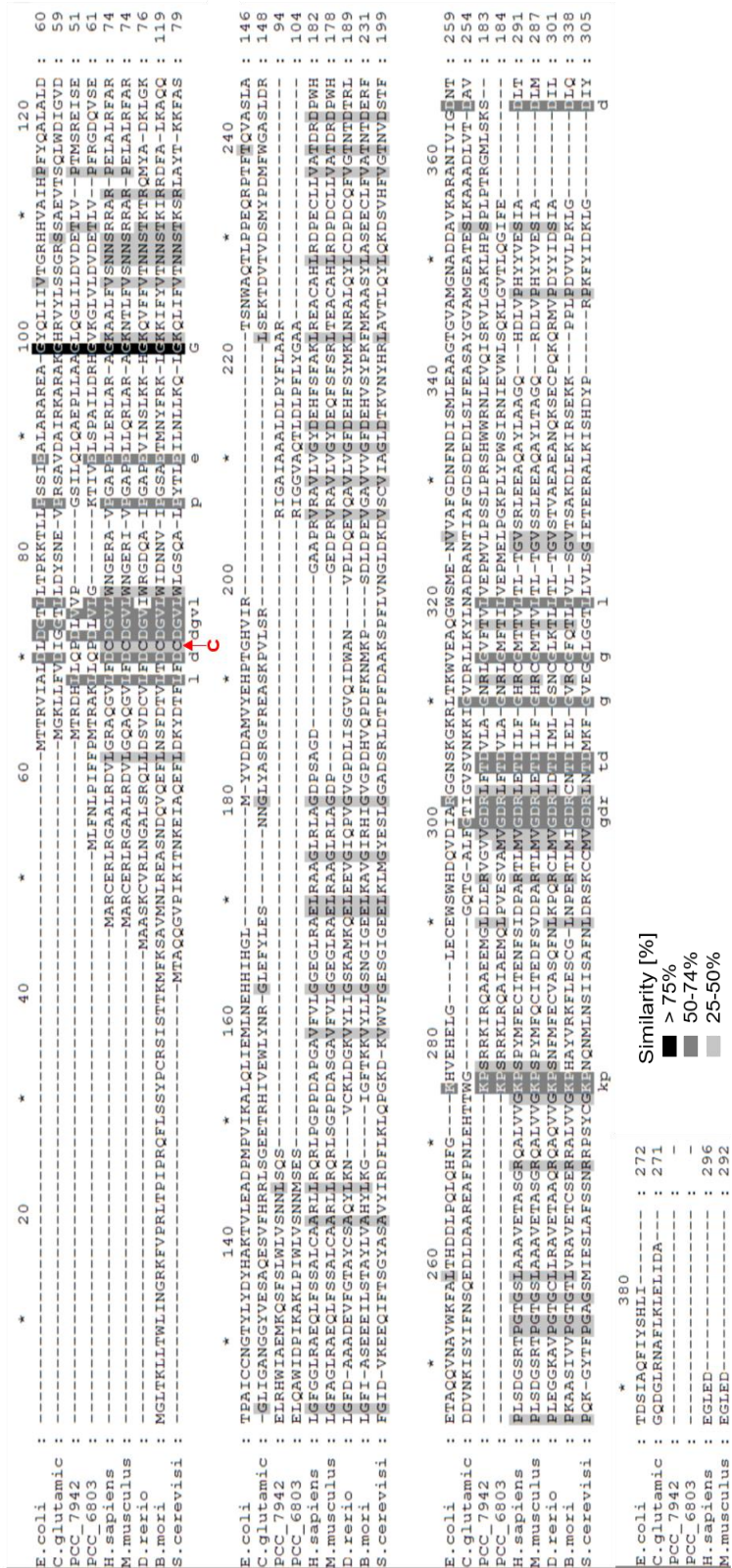


図 25 YbaA および PLP phosphatase として予測されたアミノ酸配列アライメント
 図中赤矢印で示す cysteine 残基は H. sapiens で同定された hPLPP (human PLP phosphatase) の活性化中心を示す。

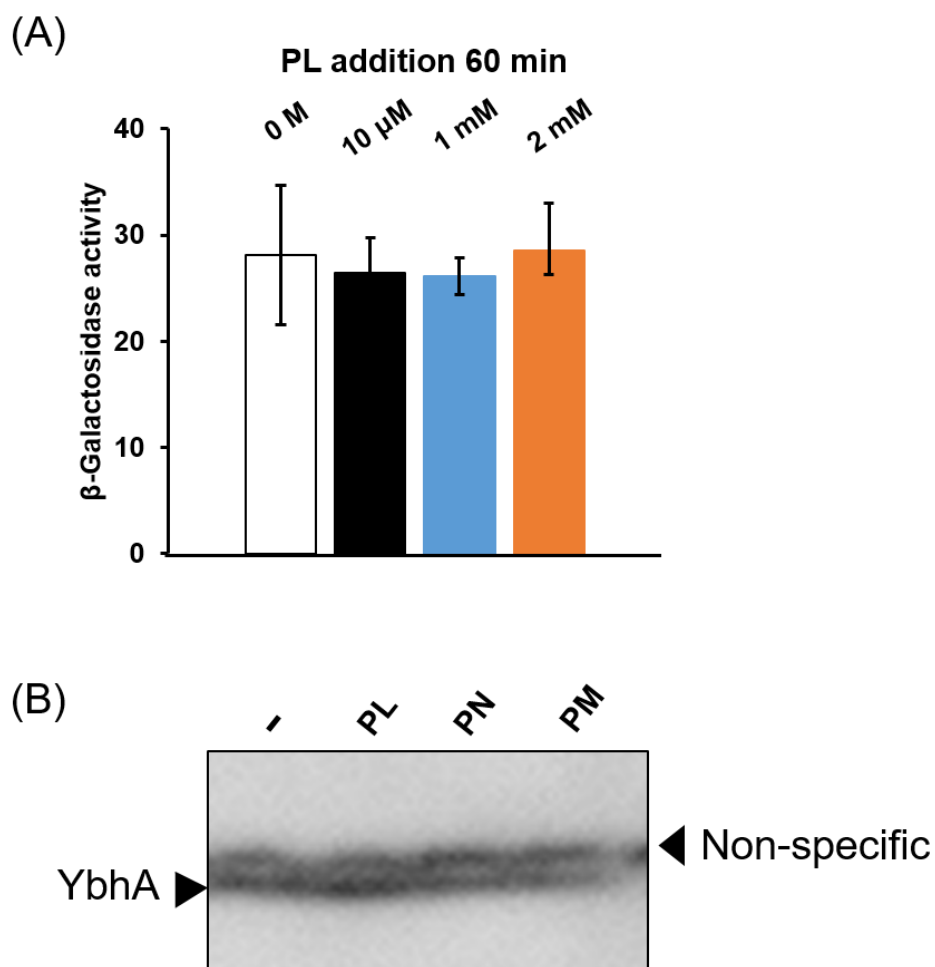


図 26 *ybhA* 遺伝子の発現は PLP 蓄積による制御は受けない

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で培養した。(A) pRS551-*ybhA* プラスミドで形質転換した log phase ($OD_{600} = 0.4$) の大腸菌野生株培養液に各濃度の PL を添加し、1 時間後に β -galactosidase 活性を測定した。(B) log phase ($OD_{600} = 0.4$) における *ybhA*-His 株培養液に、2 mM PL、PN、PM をそれぞれ添加し、1 時間後の培養液を回収、タンパク質可溶性画分を抽出し、12% gel 上で SDS-PAGE を行い、6 \times His tag 抗体で検出した (Tanaka et al., 1993)。

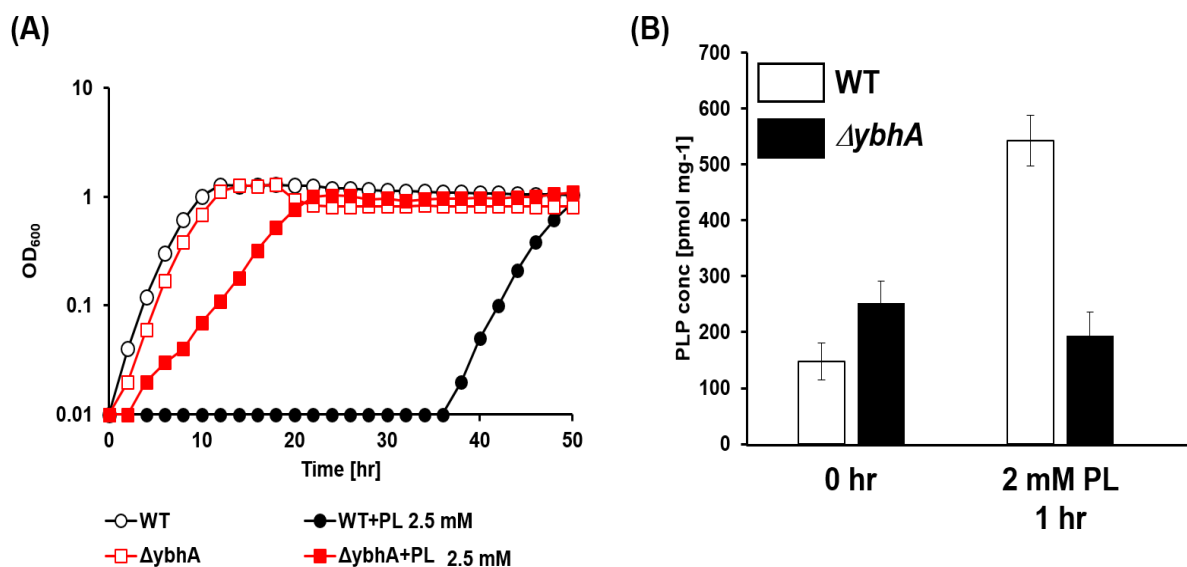


図 27 $\Delta ybhA$ 株は、PL 添加に対して PLP の蓄積が生じず増殖開始の遅延を示さない
 0.2% グルコース を炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌の培養に利用し、2 時間毎
 に OD₆₀₀ を測定した。(A) 大腸菌野生株 (BW25113 株) および $\Delta ybhA$ 株の増殖測定
 を 2.5 mM PL 添加条件下で行った。(B) 2 mM PL 添加 1 時間後の大腸菌野生株およ
 び $\Delta ybhA$ 株の細胞内 PLP 濃度を HPLC により解析、定量した。

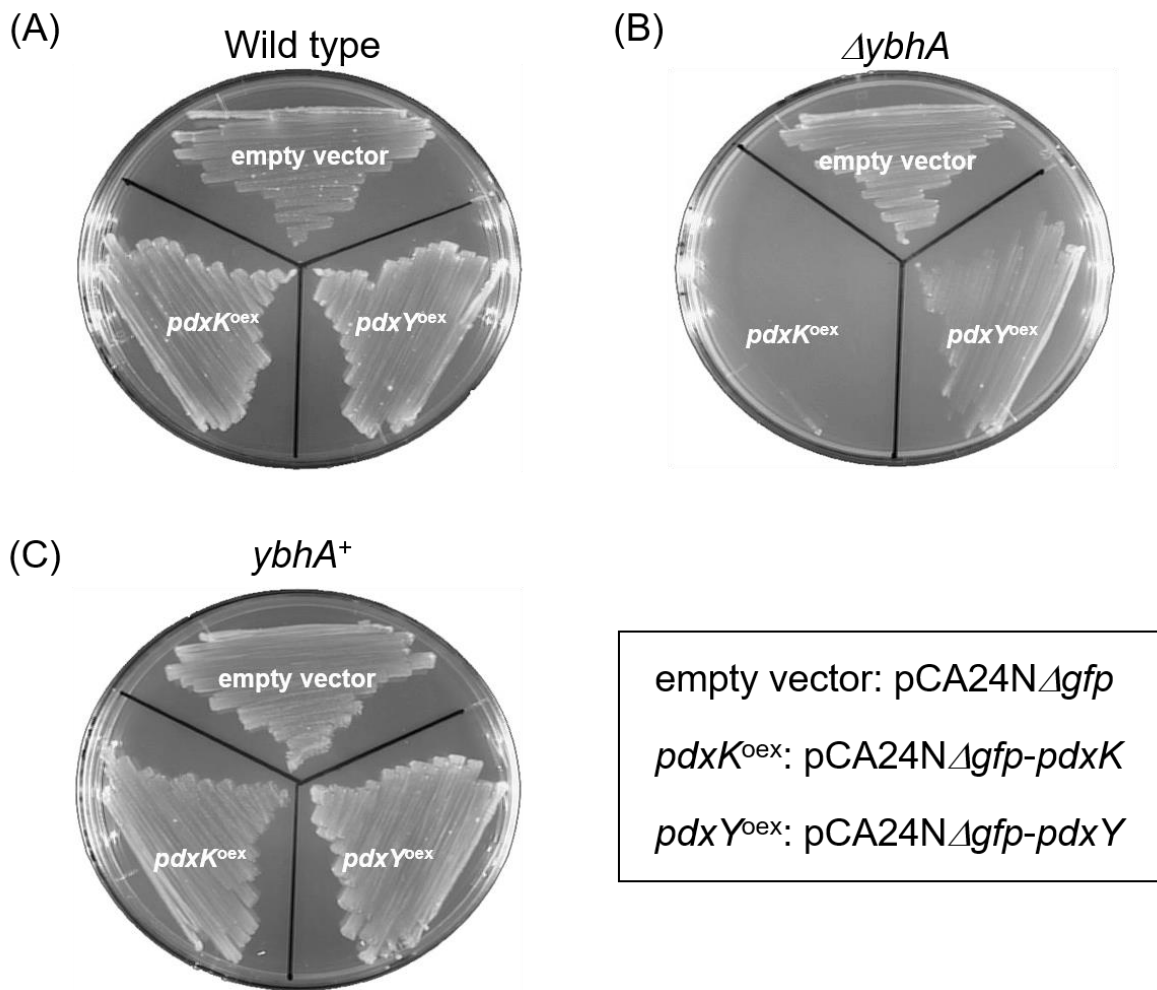


図 28 $\Delta ybhA$ 株は、 $pdxK$ および $pdxY$ 遺伝子過剰発現の影響を相殺できない
 500 μM IPTG を含む 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地上で、
 30°C、24 時間静置培養を行った。(A) 野生株 (BW25113 株)、(B) $\Delta ybhA$ 、(C) $ybhA$ 復
 帰株 ($ybhA^+$)、それぞれの大腸菌株にて、 $pdxK$ および $pdxY$ 遺伝子過剰発現を誘導
 し増殖を観察した。図中 $pdxK^{\text{oex}}$ 、 $pdxY^{\text{oex}}$ は過剰発現を示す。

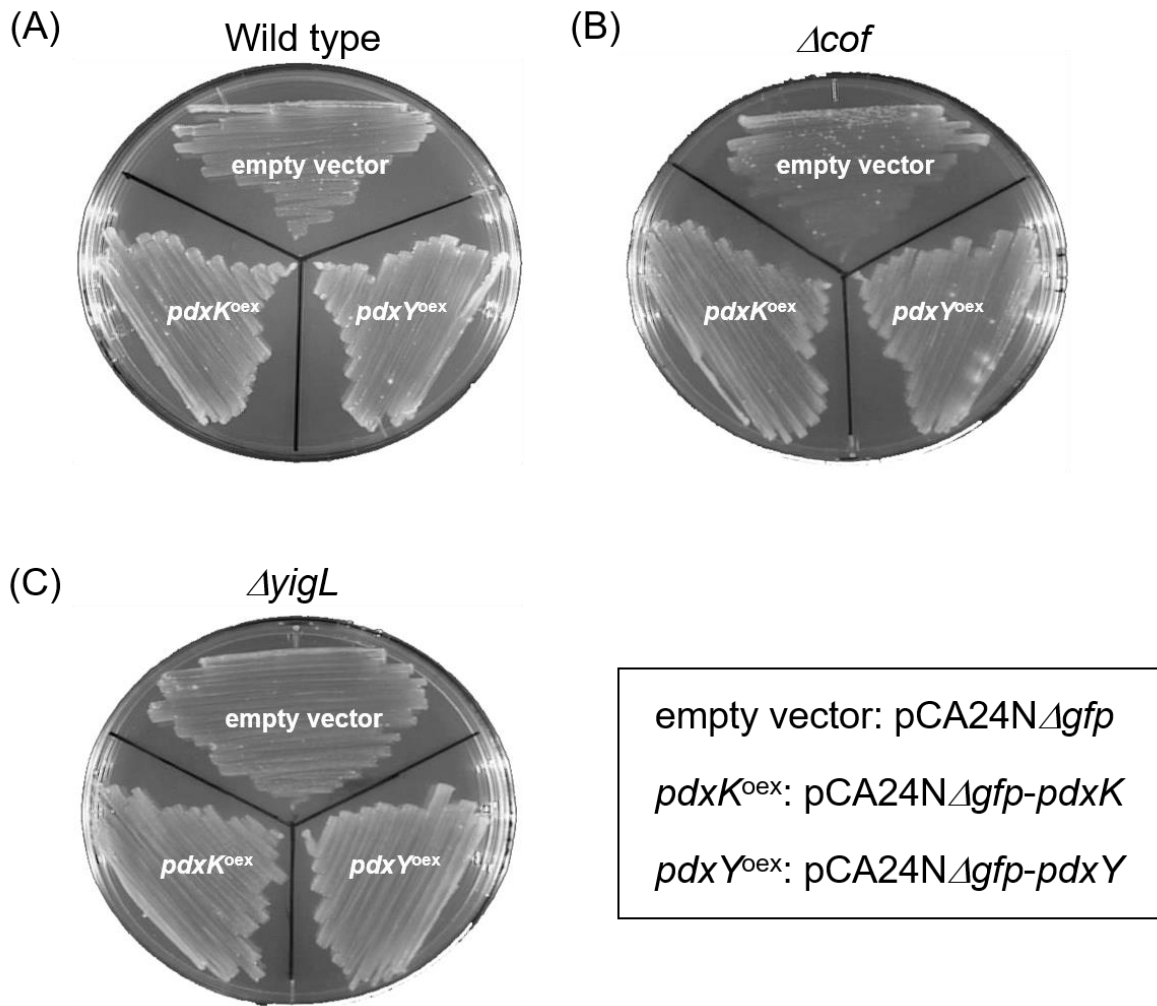


図 29 Δcof および $\Delta yigL$ 株は、PdxK、PdxY 過剰発現の影響を受けない
 500 μM IPTG を含む 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地上で、
 30°C、24 時間静置培養を行った。(A) 野生株 (BW25113 株)、(B) Δcof 、(C) $\Delta yigL$ 株、
 それぞれの大腸菌株にて、*pdxK* および *pdxY* 遺伝子の過剰発現を誘導し増殖を観察し
 た。図中 *pdxK*^{oex}、*pdxY*^{oex} は過剰発現を示す。

3.4 考察

本章では、可溶性 HAD-like 脱リン酸化酵素ファミリーの *in vitro* screening 系により PLP 脱リン酸化活性を示すことが明らかにされた (Kuznetsova et al., 2006) YbhA、Cof、YigL を対象として PLP 蓄積に寄与するか検証を進めた。その結果、YbhA 過剰発現株のみ PL 添加による増殖開始の遅延を著しく阻害し (図 23)、また、YbhA 過剰発現により生じる増殖速度の低下が PLP の欠乏に起因することが示唆された (図 24)。

1 章において、グルコースおよび酢酸を炭素源とした際にはプロモーター活性に変化が観察されなかった (図 7 (D))。そこで、*ybhA* 遺伝子の発現は PLP 蓄積をシグナルとして調節されると考え、PLP 蓄積条件下における *ybhA* 遺伝子プロモーター活性および細胞内 YbhA 量を測定したが、PL を培養液中に添加しなかったコントロールと比較して差が観察されなかった (図 26)。従って、*ybhA* 遺伝子発現は未知の機構により遺伝子発現の制御がされることが示唆された。また、PLP 脱リン酸化において YbhA は量的な活性調節を行うわけではなく、タンパク質修飾に依存した形式で YbhA 活性が制御されていると考えられる。

$\Delta ybhA$ 、 Δcof 、 $\Delta yigL$ 株において PdxK、PdxY 過剰発現による PLP 蓄積状態を模倣した際、 $\Delta ybhA$ でのみ増殖が阻害された。これらの結果は、YbhA が細胞内で PLP 脱リン酸化酵素として機能することで PLP 蓄積を阻害するという仮説を支持するものである。 $\Delta ybhA$ 株において、PL/PM/PN kinase PdxK または PLkinase PdxY を過剰発現した際、PdxY 過剰発現による増殖阻害は PdxK と比べ僅かなものであった (図 28)。PdxK は、PdxY と比べて約 100 倍酵素活性が強いことが明らかにされており、今回本研究で得られた結果も、PdxK および PdxY の酵素活性の違いに由来すると考えられる。Kuznetsova らの報告によると、YbhA、Cof、YigL が PLP に対して示すミカエリス-メンテン定数 K_m は、それぞれ 0.37、0.68、1.5 mM であることが明らかにされており (Kuznetsova et al., 2006)、大腸菌から見つかった PLP 脱リン酸化酵素において YbhA

が最も PLP との親和性が大きいことも本研究結果を支持するものであると考えることができる。しかし、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地における $\Delta ybhA$ 株の増殖測定を行った際、予測とは反対に PL 添加による増殖開始の遅延が生じず、PLP の蓄積も観察されなかった（図 27）。このことから、YbhA は直接的、または、間接的に細胞内への PL 移送に関与することが示唆されたが、PL 取り込みに関する機構は未解明であり、今後の課題として残る。

参考文献

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **62**, 293–300.

Cherepanov, P. P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, **158**, 9–14.

Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640–6645.

Dempsey, W. B., and Pachler, P. F. (1966). Isolation and characterization of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **91**, 642–645.

Fonda, M. L. (1992). Purification and characterization of vitamin B₆-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15978–15983.

Gao, G., and Fonda, M. L. (1994). Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B₆ phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7163–7168.

Ghatge, M. S., Contestabile, R., di Salvo, M. L., Desai, J. V., Gandhi, A. K., Camara, C. M., Florio, R., González, I. N., Parroni, A., Schirch, V., and Safo, M. K. (2012). Pyridoxal 5'-Phosphate is a Slow Tight Binding Inhibitor of *E. coli* Pyridoxal Kinase. *PLoS One*, **7**, 16–19.

Ghatge, M. S., Karve, S. S., David, T. M. S., Ahmed, M. H., Musayev, F. N., Cunningham, K., Schirch, V., and Safo, M. K. (2016). Inactive mutants of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase: A possible role for a noncatalytic pyridoxal 5'-phosphate tight binding site. *FEBS Open Bio.*, **6**, 398–408.

Gospe, S. M. (2009). Neonatal vitamin-responsive epileptic encephalopathies. *Chang Gung Med. J.*, **33**, 1–12.

Keseler, I. M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M., and Karp, P. D. (2005). EcoCyc: A comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 334–337.

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., and Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.*, **12**, 291–9.

Koonin, E. V., and Tatusov, R. L. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J. Mol. Biol.*, **244**, 125-132.

Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I., Carmel, L., Wolf, Y. I., Mori, H., Savchenko, A. V., Arrowsmith, C. H., Koonin, E. V., Edwards, A. M., and Yakunin, A. F. (2006). Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J. Biol. Chem.*, 281, 36149–36161.

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 597-600.

Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Saavedra, M. A., Contestabile, R., Ghatge, M. S., Haynes, A., Schrich, V., and Safo, M. K. (2009). Molecular basis of reduced pyridoxine 5'-phosphate oxidase catalytic activity in neonatal epileptic encephalopathy disorder. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30949–30956.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria Culture Medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736–747.

Piskiewicz, D., Landon, M., and Smith, E. (1970). Bovine liver glutamate dehydrogenase SEQUENCE OF A HEXADECAPETIDE CONTAINING A LYSYL RESIDUE REACTIVE WITH PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2622–2626.

Rippa, M., Spanio, L., and Pontremoli, S. (1967). A Specific Interaction of Pyridoxal 5'-Phosphate and 6-Phosphogluconic Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 48–57.

Shimada, T., Tanaka, K., (2016). Use of a Bacterial Luciferase Monitoring System to Estimate Real-time Dynamics of Intracellular Metabolism in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5960-5968.

Strausbaucht, P. H., and Fischer, E. H. (1969). Structure of the Binding Site of Pyridoxal 5'-Phosphate to *Escherichia coli* Glutamate Decarboxylase. *Biochemistry*, **9**, 233–238.

Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. and Takahashi, H. (1993) Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 3511-3515.

White, R. S., and Dempsey, W. B. (1970). Purification and properties of vitamin B₆ kinase from *Escherichia coli* B. *Biochemistry*, **9**, 4057–4064.

Yang, Y., Tsui, H. T., Man, T., and Winkler, M. E. (1998). Identification and Function of the *pdxY* Gene , Which Encodes a Novel Pyridoxal Kinase Involved in the Salvage Pathway of Pyridoxal 5'-Phosphate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1814–1821.

Zhao, G., and Winkler, M. E. (1995). Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **177**, 883–891.

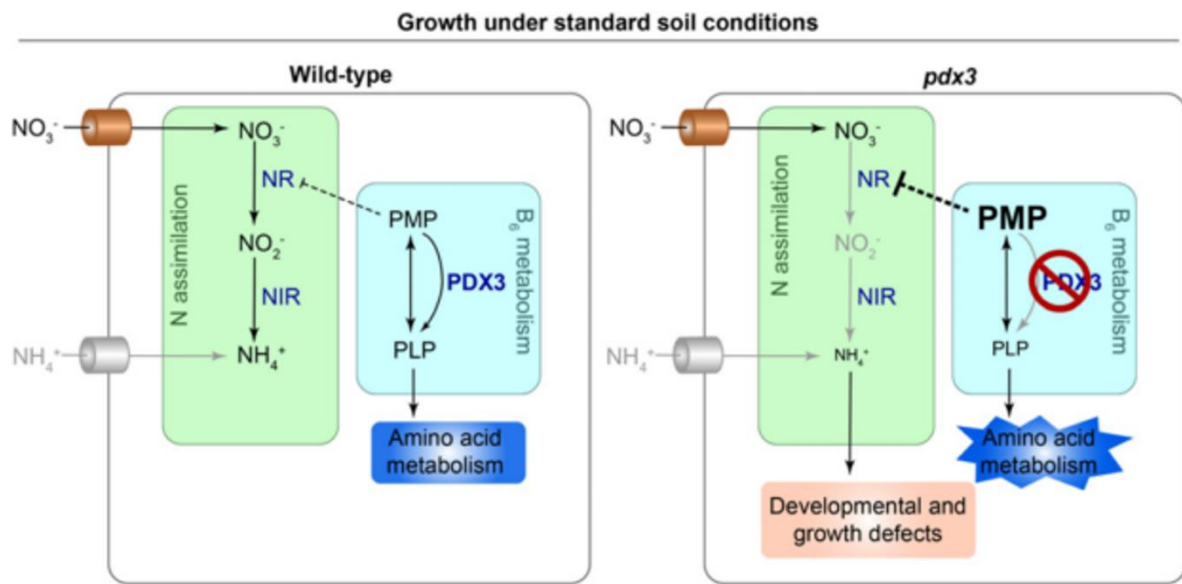
4. PLP 蓄積・欠乏による代謝への影響

4.1 序

近年、Vitamin B₆ である PMP、PNP の恒常性に関して、シロイヌナズナおよび大腸菌において報告がされた (Colinas et al., 2016; Prunetti et al., 2016)。Colinas らの報告において、シロイヌナズナの生育および分化の阻害が観察された PMP/PNP 酸化酵素 PDX3 変異株において PMP の蓄積が引き起こされ、代謝、特にアミノ酸代謝に著しく影響が生じることによりアミノ酸が蓄積されることを明らかにした。さらにアンモニウム塩の添加によりその表現型が抑圧されたことから、PMP 蓄積が硝酸還元酵素 NR の活性を阻害することでアミノ酸代謝に影響が生じることを提案した (図 30) (Colinas et al., 2016)。Prunetti らは大腸菌を用いた研究を展開し、全生物に広く保存されている COG0325 タンパク質ファミリーに分類される *yggS* 遺伝子の欠損株が PN に対して感受性を示し、PNP 蓄積による増殖阻害が引き起こされる現象を発見した。さらに彼らは、蓄積した PNP が PLP 依存で分岐鎖アミノ酸 (valine、leucine、isoleucine) 合成の最終段階を触媒するアミノ基転移酵素 IlvE の活性に影響を及ぼすことにより、PN 感受性をもたらすことを示唆しているが詳細な機構に関しては未解明である (Prunetti et al., 2016)。

本研究では、初めて大腸菌野生株 (BW25113 株) 培養液に PL を添加することで PLP が蓄積され、増殖開始の遅延が生じる現象を発見した。さらに、様々な基質に対して脱リン酸化活性を示し生理機能が未知であった YbhA が PLP 脱リン酸化を触媒することで PLP 蓄積を阻害することが示唆された。しかし、PL 添加による PLP の蓄積および YbhA 過剰発現による PLP の欠乏で観察された増殖阻害が、どのような機構により引き起こされるかは未解明であるが、上述した既往研究 (Colinas et al., 2016; Prunetti et al., 2016) および、PLP の生理機能から、アミノ酸代謝異常増殖阻害が PLP 蓄積により引き起こされていると推測された。

そこで、本章では細胞内 PLP 蓄積による増殖開始の遅延、および、*ybhA* 遺伝子過剰発現によって引き起こされる PLP 欠乏時に観察された増殖速度の低下の機構に関して解析を進めた。



(Colinas et al., 2016)より引用

図 30 シロイヌナズナにおける PMP 蓄積による増殖阻害モデル

左図: 標準的な土壌条件下において、野生型シロイヌナズナは窒素源として硝酸 (NO_3^-) を取り込み、硝酸還元酵素 NR さらに亜硝酸還元酵素 NIR により 2 段階の還元反応によりアンモニアへと変換され、アミノ酸等に同化され生育する。右図: PMP 酸化酵素 PDX3 変異型シロイヌナズナ *pdx3* では、PMP を PLP へと酸化することができず、PMP が蓄積する。蓄積した PMP が NR 活性を阻害することで、アンモニアを生合成できないため、生育および分化不全が生じる (Colinas et al., 2016)。

4.2 材料と方法

4.2.1 試薬類

純度 99.0% 以上の MOPS および Tricine は同仁化学研究所より購入した。試薬特級 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 K_2HPO_4 、 H_3BO_3 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、メタノール、クロロホルムは和光純薬工業株式会社より購入した。また、試薬一級 K_2SO_4 は和光純薬工業より購入した。分子生物学用 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ も同様に和光純薬工業株式会社より購入した。試薬特級 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ はナカライテスク株式会社より購入した。超純水は、MERC MILLIPORE 社 Q-POD を用いて取水した。純度 99% 以上のピリドキサル塩酸塩は、SIGMA-ALDRICH より購入した。

4.2.2 使用菌株およびプライマー、プラスミド

本研究で使用した大腸菌株一覧を表 4.2.1 に示す。

4.2.3 実験方法

カザミノ酸が PLP 蓄積および欠乏時の増殖阻害に与える影響

pCA24N Δ gfp プラスミドで形質転換した大腸菌に関しては、 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Chrolamphenicol を添加した下記の培地で培養を行った。
LB 寒天培地 (Bertani, 1951) に BW25113 株、*pCA24N Δ gfp-empty* または *pCA24N Δ gfp-ybhA* で形質転換した BW25113 株を画線培養し、 30°C に一晩置き静置培養を行い、コロニーを得た。そこで得た各々の株のシングルコロニーを、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地 (Neidhardt, Bloch, and Smith, 1974) へと白金耳に画線培養し、 30°C 、一晩静置培養した。前培養液は、MOPS 最少寒天培地上に生えたそれぞれのシングルコロニーを、3 mL の 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培

地へと白金耳を用いて植菌し、150 rpm、30°C、24 時間振とう培養することで得た。本培養は、5 mL 同培地に 500 分の 1 倍量の前培養液を植菌し、150 rpm、30°C にて震とう培養することで行った。その際、2mM PL、アミノ酸混合液として 0.2% casamino acids を添加した。増殖測定は、2 時間毎に $\lambda = 600 \text{ nm}$ における濁度 (OD_{600}) を OD-Monitor C & T instrument (TAITEC) を使用して測定した。

また、0.2% casamino acids 含有 MOPS 最少寒天培地上で行った pCA24N Δ gfp-pdxK、pCA24N Δ gfp-pdxY で形質転換した Δ ybhA 株の増殖測定は、0.2% グルコースを炭素源とし、PdxK および PdxY の過剰発現誘導のため 500 μM IPTG を添加した。培養は、30°C、24 時間静置することで行った。

野生株および ybhA 遺伝子過剰発現株における PLP 蓄積・欠乏時のメタボローム解析

メタボローム解析は、Saito らの手法で行った (Saito et al., 2009)。

オートクレーブにて 120°C、20 分間滅菌処理を施した 300 mL 三角フラスコ内に、0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を 100 mL 調整した。そこへ、同培地 3 mL にて前培養した大腸菌野生株を 500 分の 1 量植菌し、30°C、150 rpm で震とう培養を行った。細胞増殖は、DU640 SPECTROMETER (BECKMAN) にて OD_{600} を測定した。対数増殖期 ($\text{OD}_{600} = 0.5$) に達した際、500 mM PL を終濃度 2 mM になるよう添加し、1 時間後に MERC MILLIPORE 社製 Isopore Membrane HTTP Filter (0.4 μm) を用いて菌体を回収した。菌体回収後速やかに超純水にて菌体を洗浄し、2 mL メタノールに菌体が吸着したフィルターを浸し、30 秒間 超音波洗浄機 (AS52GTU, ASONE) にて超音波処理を施し、10 分間静置し、細胞懸濁液を得た。10 分後、その 1.6 mL の細胞懸濁液に同量のクロロホルムおよび 640 μL 超純水を添加し、ボルテックスにて再懸濁した。再懸濁液を 4°C、5 分間、4600 g にて遠心分離 (CF16RXII, HITACHI) し、水溶性画分を回収した。タンパク質等の生体高分子は、Ultra-free MC (MERC MILLIPORE)

により除去し、水溶性画分を乾燥させた。その後、乾燥させた水溶性画分を 25 μ L の超純水にて再懸濁し、capillary-electrophoresis time-of-flight MS (CE-TOF-MS) にて代謝産物の同定および定量を行った。

表 4.2.1 本研究で使⽤した大腸菌株および遺伝型

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	Source
BW25113	W3110 <i>lacI^q rrnBT14 ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78</i>	Keio collection (Baba et al., 2006)
<i>ΔybhA</i>	BW25113 <i>ybhA::Km^R</i>	Keio collection (Baba et al., 2006)

表 4.2.2 本研究で使⽤したプラスミド

Plasmid	Source
pCA24NΔ <i>gfp</i>	ASKA library (Kitagawa et al., 2005)
pCA24NΔ <i>gfp-ybhA</i>	ASKA library (Kitagawa et al., 2005)
pCA24NΔ <i>gfp-pdxK</i>	ASKA library (Kitagawa et al., 2005)
pCA24NΔ <i>gfp-pdxY</i>	ASKA library (Kitagawa et al., 2005)

4.3 結果

4.3.1 カザミノ酸が PLP 蓄積および欠乏時の増殖阻害に与える影響

PLP は、アミノ酸代謝に関与するアミノ基転移、脱炭酸、ラセミゼーション反応等を触媒する酵素の補酵素であり、これらの酵素活性制御を担っている (Fitzpatrick et al., 2007; John, 1995)。従って、これらの表現型がアミノ酸代謝異常に起因することが考えられた。そこで本研究ではアミノ酸添加による PLP 蓄積、および、欠乏時に観察された増殖阻害 (図 18 および図 24) に対する影響の観察を行った。

まずカザミノ酸をアミノ酸源として、2.5 mM PL を添加した大腸菌野生株の培養液中へ添加した際の増殖測定を行った。その結果、カザミノ酸無添加の培養液では、35 時間の増殖開始の遅延が観察される一方で、カザミノ酸含有培養液では 6 時間の増殖開始遅延となり、著しく PLP 蓄積による増殖開始阻害を緩和した (図 31 (A))。

また、pCA24N Δ gfp-ybhA プラスミド上からの YbhA 過剰生産による PLP 欠乏から引き起こされた増殖阻害に関しても、カザミノ酸添加により著しく緩和された (図 31 (B))。さらに、 Δ ybhA 株において PL/PM/PN kinase PdxK および PL kinase PdxY を過剰発現した際にそれぞれ増殖阻害が観察されたが (図 28)、カザミノ酸添加によりその表現型が抑圧された (図 32)。

これらの結果から、PLP 欠乏だけでなく蓄積もまた、アミノ酸代謝の異常を引き起こすことで増殖開始を阻害することが示唆された。

4.3.2 野生株における PLP 蓄積時のメタボローム解析

前節で、PLP 恒常性の崩壊時（蓄積および欠乏）に観察される増殖阻害が、カザミノ酸添加により著しく緩和された結果を得た。このことから、アミノ酸代謝の異常が PLP 蓄積により引き起こされており、それがカザミノ酸により相補されたことで増殖が可能になったことが示唆された。そこで、本節では対数増殖気 ($OD_{600} = 0.5$) の大腸菌野生株培養液中に 2 mM PL を添加し 1 時間培養した後のサンプルを利用して、メタボローム解析を行い PLP 蓄積による代謝への影響を解析した。データ解析は、2 mM PL を添加した大腸菌野生株培養液および PL 無添加条件の培養液を比較し行った。表 4.3.1 に PLP 蓄積時のメタボローム解析結果を示す。

① 解糖系における代謝産物

結果として、解糖系においては Pyruvate にのみ、PLP 蓄積によって 1.4 倍の蓄積が観察された。その一方で、Glucose-6-phosphate や Fructose-1,6-bisphosphate 等は PL を添加していない細胞と比較して、平均 0.78 倍の蓄積量に留まり、減少する傾向にあることが明らかとなった（表 4.3.1、図 33 (A)）。

② TCA cycle における代謝産物

TCA cycle を介在する代謝産物、Citrate や Fumarate、Malate でそれぞれ 1.6 倍、1.8 倍、1.7 倍の蓄積が認められ、その一方で Acetyl CoA に関しては、PL を添加しなかった細胞と比較し影響は観察されなかった（表 4.3.1、図 33 (B)）。

③ Pentose phosphate pathway における代謝産物

Pentose phosphate pathway を介在する代謝産物は、PLP 蓄積により平均 0.7 倍の蓄積量となっており減少する傾向にあった（表 4.3.1、図 33 (C)）。

④ 各アミノ酸

Glycolysis、TCA cycle、Pentose phosphate pathway それぞれの代謝産物と比較して、アミノ酸は蓄積する傾向にあり、その蓄積量も Pro では 2.3 倍、Met では 1.8 倍と変化が大きく、平均 1.5 倍蓄積することが認められた。その一方で、Arg、Asn や Tyr はそれぞれ 0.6 倍、0.73 倍、0.7 倍と減少していた（表 4.3.1、図 34）。

これらの結果から、PLP 蓄積は多様な代謝経路、特にアミノ酸代謝に影響を与えることで増殖開始の遅延を引き起こすことが示唆された。

4.3.3 Arg、Tyr、Asn、および、これら 3 種アミノ酸混合溶液添加の際の PL 添加による増殖開始遅延への影響検証

前節 4.3.2 において、過剰な PL 添加により Arg、Asn、Tyr の細胞内濃度が減少する結果を得た (図 34)。この実験から、PL 添加で生じる PLP 過剰蓄積時に観察される増殖開始の遅延は、これらアミノ酸代謝の異常に起因すると考えられた。

そこで、PL 2.5 mM を添加した大腸菌野生株培養液に、Arg、Asn、Tyr をそれぞれ 50 μ M で添加し増殖曲線を測定した。その結果、Arg、Asn、Tyr の添加は PL 添加による増殖開始の遅延を抑圧しなかった (図 35)。また、Arg、Asn、Tyr を終濃度 50 μ M になるよう混合したアミノ酸 mix を同条件の大腸菌野生株培養液に添加した際においても同様に、PL 添加による増殖開始の遅延に対する影響は小さかった (図 35)。

これらの結果は、Arg、Asn、Tyr の欠乏だけが増殖開始の遅延の原因ではないことを示しており、増殖開始にはアミノ酸代謝の恒常性が極めて重要であることを示唆している。

4.3.4 *ybhA* 遺伝子過剰発現による PLP 欠乏時におけるメタボローム解析

4.3.1 節において、*ybhA* 過剰発現による増殖阻害がカザミノ酸添加により著しく抑圧された (図 31 (B))。この結果は、PLP 欠乏による増殖阻害は PLP 蓄積時と同様にアミノ酸代謝異常に起因することを示唆している。そこで、本節ではコントロール株として pCA24N Δ *gfp*-empty、および、PLP 欠乏を誘導させるため pCA24N Δ *gfp-ybhA* プラスミドで形質転換した大腸菌野生株のサンプルを利用して、メタボローム解析を行い PLP 欠乏時の代謝への影響を解析した。データ解析は、*ybhA* 遺伝子過剰発現株および コントロール株のメタボローム解析結果を比較し行った。表 4.3.2 に PLP 欠乏時のメタボローム解析結果を示す。

① 解糖系における代謝産物

解糖系においては PLP 欠乏時においては代謝産物の全てで減少が観察された。特に、細胞内 G6P、Pyruvate 濃度は、*ybhA* 遺伝子を過剰発現させなかった場合と比較して半減していた (表 4.3.2、図 33 (A))。

② TCA cycle における代謝産物

TCA cycle を介在する代謝産物では、Acetyl CoA の細胞内濃度がコントロールと比較し約 8 倍蓄積されていた。また、Citrate においてはコントロールと比較し 0.3 倍程度の量にまで減少していた。Succinate、Fumarate、Malate においては大きな変化はなかった (表 4.3.2、図 33 (B))。

③ Pentose phosphate pathway における代謝産物

Pentose phosphate pathway を介在する代謝産物は、PLP 欠乏により平均 0.7 倍の蓄積量となっており減少する傾向にあった (表 4.3.2、図 33 (C))。しかし、その一方で、Ru5P は約 12 倍の蓄積が認められた。

④ 各アミノ酸

細胞内各種アミノ酸量は減少する傾向にあり、その減少量も Gly では 0.5 倍、Val では 0.3 倍程度にまで減少しており、平均 0.6 倍減少することが認められた。その一方で、Glu の細胞内濃度はコントロールと比較して変化なかった。(表 4.3.2、図 34)。さらに、PLP 蓄積時に 0.6 倍程度まで減少した Arg が、欠乏時には約 5 倍蓄積していた。

これらの結果から、*ybhA* 遺伝子過剰発現による PLP 欠乏もまた、PLP 蓄積の場合と同様に多様な代謝経路、特にアミノ酸代謝に影響を与えることがメタボローム解析より明らかになった。また、PLP 欠乏によるアミノ酸代謝に与える影響は、PLP 蓄積とは大きく異なることが示唆された。

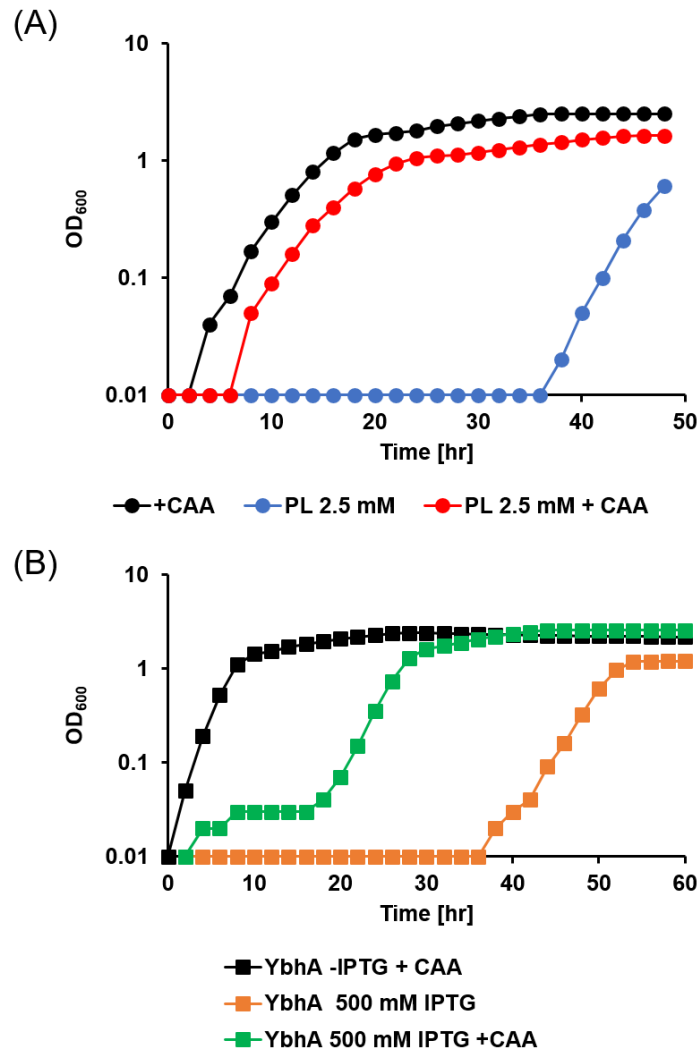


図 31 PLP 蓄積および欠乏による増殖阻害は、カザミノ酸添加で抑圧される
 30°C、150 rpm において 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で、大腸菌の培養に利用し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。カザミノ酸は終濃度 0.2% になるよう添加した。(A) 大腸菌野生株 (BW25113 株) の増殖曲線。(B) pCA24NΔgfp-ybhA プラスミドを形質転換し、YbhA を過剰発言する大腸菌野生株 (BW25113 株) の増殖曲線。

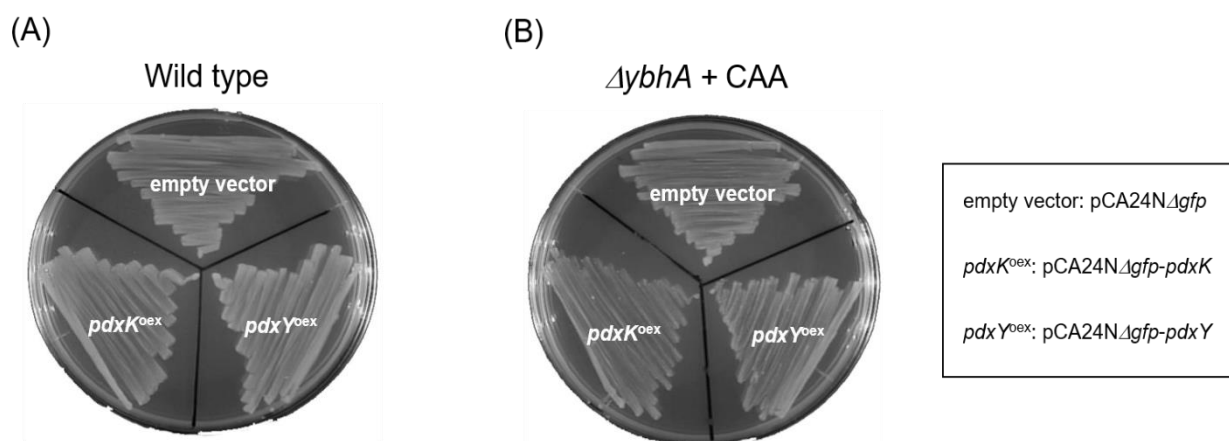


図 32 カザミノ酸添加は、 $\Delta ybhA$ 株における PdxK および PdxY 過剰発現による増殖阻害を抑圧する。

500 μ M IPTG、0.2% カザミノ酸 (CAA: Casamino acids) を含む 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少寒天培地上で、30°C、24 時間静置培養を行った。(A) 野生株 BW25113、(B) $\Delta ybhA$ 、それぞれの大腸菌株にて *pdxK*、*pdxY* 遺伝子の過剰発現を誘導し増殖を観察した。図中 *pdxK*^{oex}、*pdxY*^{oex} は過剰発現を示す。

表 4.3.1 PLP 蓄積時におけるメタボローム解析結果

Metabolites	Concentration [pmol/OD/mL]		Ratio (+PL/-PL)
	BW25113	BW25113 + 2 mM PL	
G6P	76.89	65.63	0.85
F6P	24.69	23.28	0.94
F1,6P	64.20	38.86	0.61
G3P	4.26	N/A	N/A
2,3-DPG	10.27	8.40	0.82
3PG	1128.83	878.95	0.78
2PG	N/A	N/A	N/A
PEP	444.39	296.94	0.67
Pyruvate	42.27	58.97	1.40
Acetyl CoA	23.96	21.88	0.91
Citrate	20.19	32.17	1.59
cis-Aconitate	N/A	N/A	N/A
Isocitrate	N/A	N/A	N/A
2-Oxoglutarate	N/A	N/A	N/A
Succinyl CoA	N/A	N/A	N/A
Succinate	70.43	78.27	1.11
Fumarate	41.60	74.98	1.80
Malate	81.99	136.88	1.67
6PG	10.47	7.91	0.76
Ru5P	28.27	36.65	1.30
R5P	11.13	8.34	0.75
S7P	71.04	41.90	0.59
G3P	4.26	N/A	N/A
Gly	275.76	256.10	0.93
Ala	294.25	418.15	1.42
Ser	116.87	180.89	1.55
Pro	178.98	416.30	2.33
Val	360.85	491.04	1.36
Thr	451.90	584.93	1.29
Cys	N/A	N/A	N/A
Ile	173.63	257.11	1.48
Leu	198.60	254.11	1.28
Asn	749.68	545.62	0.73
Asp	1118.03	1023.05	0.92

Gln	865.92	1111.22	1.28
Lys	4577.00	5564.18	1.22
Glu	1837.76	3251.76	1.77
Met	35.78	46.87	1.31
His	106.03	187.30	1.77
Phe	196.58	168.19	0.86
Arg	497.76	299.68	0.60
Tyr	193.59	135.53	0.70
Trp	52.56	60.31	1.15

表中の各文字の色は、次に示すように代謝経路毎の代謝産物であることを示す。黒;

Glycolysis、紺; TCA cycle、黄; Pentose phosphate pathway、青; Amino acid。

略称: G6P; Glucose-6-phosphate、F6P; Fructose-6-phosphate、F1,6P; Fructose-1,6-diphosphate、2,3-DPG; 2,3-bisphospho-glycerate、3PG; 3-phospho-glycerate、PEP; Phosphoenol-pyruvate、6PG; 6-phosphogluconage、Ru5P; Ribulose-5-phosphate、R5P; Ribose-5-phosphate、S7P; Sedoheptulose-7-phosphate。N/A は検出不可であったことを示す。

表 4.3.2 YbhA 過剰発現による PLP 欠乏時の際のメタボローム解析結果

Metabolites	Concentration[pmol/OD/mL]		Ratio (YbhA 過剰発現株 /Control 株)
	Control 株	YbhA 過剰発現株	
G6P	29.92	15.67	0.52
F6P	14.5	6.2	0.43
F1,6P	53.65	4.48	0.08
G3P	1.95	N/A	N/A
2,3-DPG	13.8	2.0	0.15
3PG	706.1	132.7	0.19
2PG	N/A	N/A	N/A
PEP	239.8	58.4	0.24
Pyruvate	35.1	16.4	0.466
Acetyl CoA	8.9	69.7	7.82
Citrate	19.0	6.4	0.33
cis-Aconitate	N/A	N/A	N/A
Isocitrate	N/A	N/A	N/A
2-Oxoglutarate	N/A	N/A	N/A
Succinyl CoA	N/A	N/A	N/A
Succinate	64.4	64.6	1.00
Fumarate	28.8	21.1	0.73
Malate	59.2	44.1	0.74
6PG	6.1	1.4	0.22
Ru5P	19.5	224.5	11.54
R5P	18.6	6.0	0.32
S7P	32.9	25.1	0.76
G3P	1.9	N/A	N/A
Gly	464.98	247.86	0.53
Ala	417.01	371.83	0.89
Ser	90.53	71.33	0.79
Pro	172.18	137.41	0.80
Val	731.82	221.63	0.30
Thr	531.23	348.81	0.67
Cys	N/A	N/A	N/A
Ile	330.82	144.17	0.44
Leu	581.07	234.70	0.40

Asn	880.24	297.15	0.34
Asp	546.72	232.44	0.43
Gln	114.55	101.94	0.89
Lys	3314.40	1706.46	0.51
Glu	409.46	433.92	1.06
Met	181.19	84.56	0.47
His	402.72	157.17	0.39
Phe	114.19	90.45	0.79
Arg	74.48	409.08	5.49
Tyr	109.51	102.91	0.94
Trp	27.17	10.20	0.38

表中の各文字の色は、次に示すように代謝経路毎の代謝産物であることを示す。橙;

Glycolysis、灰; TCA cycle、緑; Pentose phosphate pathway、赤; Amino acid。

略称: G6P; Glucose-6-phosphate、F6P; Fructose-6-phosphate、F1,6P; Fructose-1,6-diphosphate、2,3-DPG; 2,3-bisphospho-glycerate、3PG; 3-phospho-glycerate、PEP; Phosphoenol-pyruvate、6PG; 6-phosphogluconage、Ru5P; Ribulose-5-phosphate、R5P; Ribose-5-phosphate、S7P; Sedoheptulose-7-phosphate。N/A は検出不可であったことを示す。

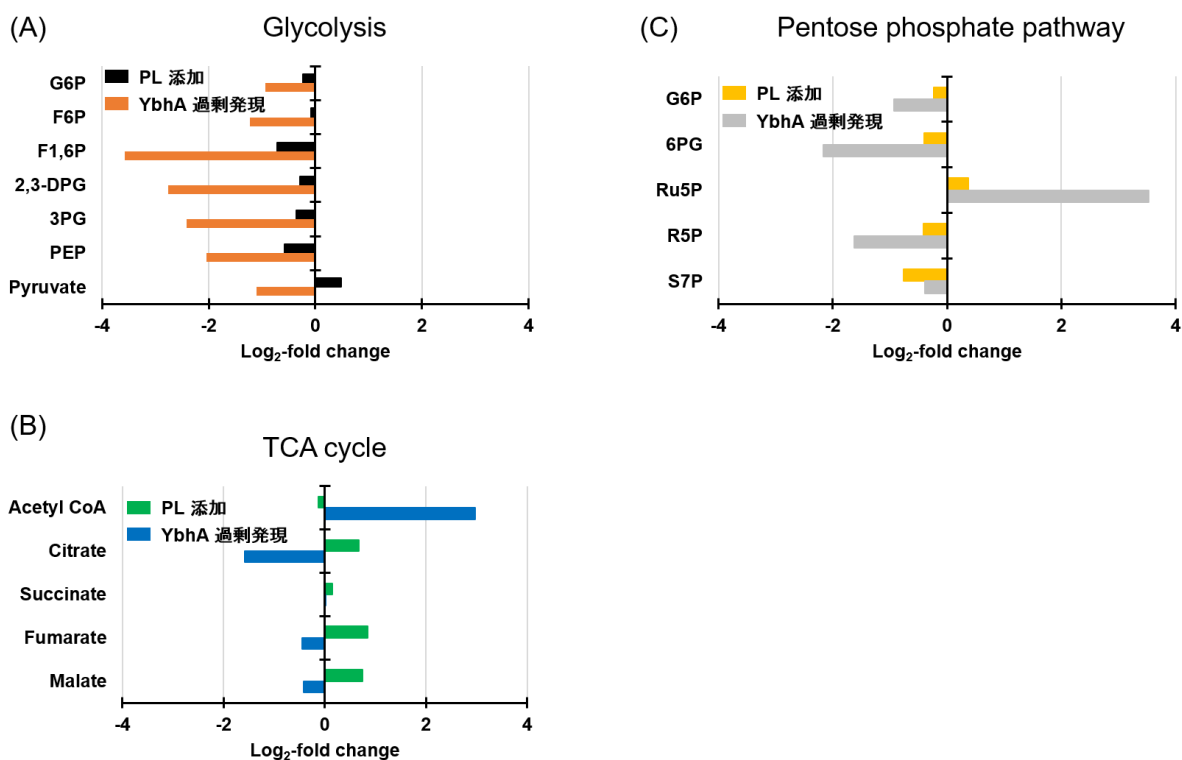


図 33 PLP 蓄積および欠乏は、中心代謝経路に影響を与える

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌野生株 (BW25113 株) の培養に利用した。2 mM PL を培養液に添加 1 時間後にサンプリングし、メタボローム解析を行った。また、pCA24NΔ*gfp*-empty プラスミド、pCA24NΔ*gfp*-*ybhA* プラスミドでそれぞれ形質転換した大腸菌野生株を、0.2% グルコースを炭素源とし、500 μM IPTG を添加した MOPS 最少培地を大腸菌野生株の培養に利用した。データは、PL を添加していない細胞、および、pCA24NΔ*gfp*-empty プラスミドで形質転換した細胞との比をそれぞれとることで処理した。(A) Glycolysis、(B) TCA cycle、(C) Pentose phosphate pathway における代謝産物の変化量。

略称: G6P; Glucose-6-phosphate、F6P; Fructose-6-phosphate、F1,6P; Fructose-1,6-diphosphate、2,3-DPG; 2,3-bisphospho-glycerate、3PG; 3-phospho-glycerate、PEP; Phosphoenol-pyruvate、6PG; 6-phosphogluconage、Ru5P; Ribulose-5-phosphate、R5P; Ribose-5-phosphate、S7P; Sedoheptulose-7-phosphate。

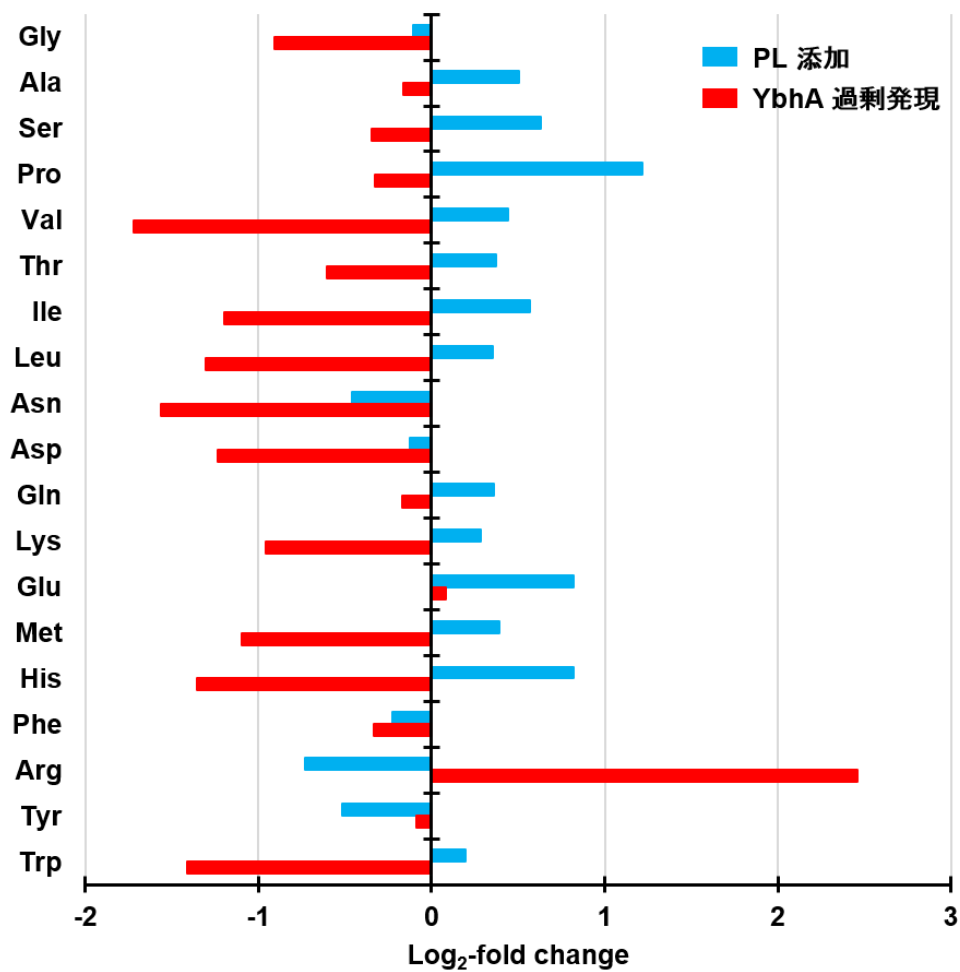


図 34 PLP 蓄積および欠乏はアミノ酸代謝異常を引き起こす

0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地を大腸菌の培養に利用した。2 mM PL を培養液に添加し、1 時間後にサンプリングし、メタボローム解析を行った。また、pCA24NΔ*gfp*-empty プラスミド、pCA24NΔ*gfp-ybhA* プラスミドでそれぞれ形質転換した大腸菌野生株を、0.2% グルコースを炭素源とし、500 μM IPTG を添加した MOPS 最少培地を大腸菌野生株の培養に利用した。データは、PL を添加していない細胞、および、pCA24NΔ*gfp*-empty プラスミドで形質転換した細胞との比をそれぞれとることで処理した。

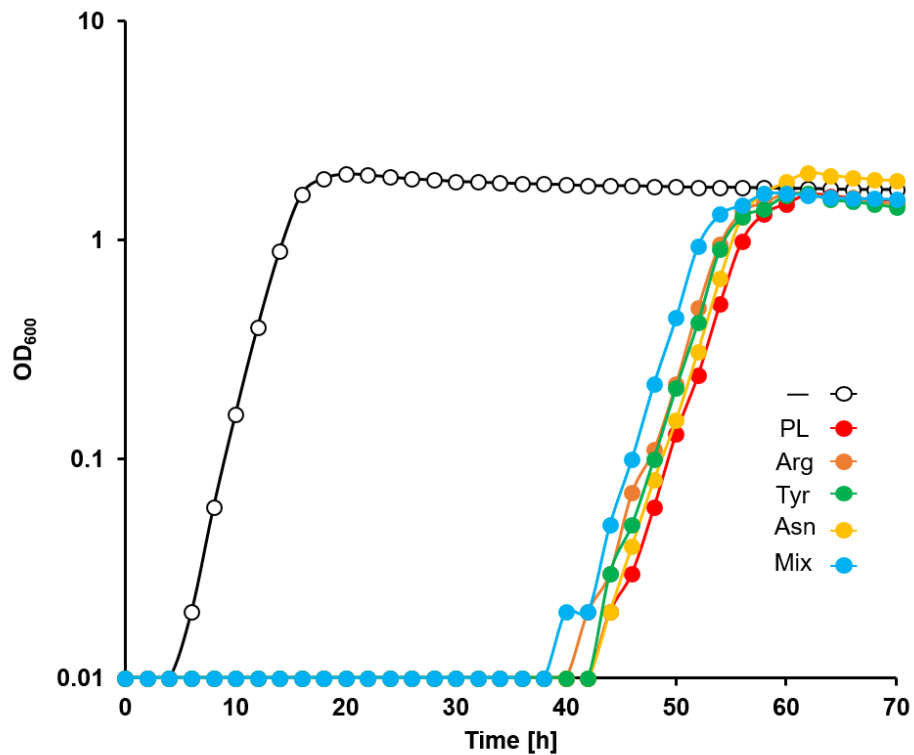


図 35 Arg、Tyr、Asn およびこれら 3 種混合アミノ酸添加による PL 添加で生じる増殖
開始遅延抑圧検証

30°C、150 rpm において 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で、大腸菌野生株 (BW25113 株) の培養に利用し、2 時間毎に OD₆₀₀ を測定した。PL は終濃度 2.5 mM になるよう培養液中に添加した。さらにその培養液に Arg、Tyr、Asn を終濃度 50 μM になるよう培養液中に添加した。また、図中 Mix は Arg、Tyr、Asn 混合溶液 (各アミノ酸終濃度 50 μM) を 2.5 mM PL 添加培養液に加えた際の増殖曲線を示す。

4.4 考察

メタボローム解析により、PLP 蓄積および欠乏における代謝産物の定量を行った。その結果、PLP 蓄積によって His、Glu、Pro において 1.8-2 倍の蓄積が認められ、Arg や Tyr では 0.6-0.7 倍程度の蓄積量であり減少することが確認された。その一方で、*ybhA* 遺伝子過剰発現による PLP 欠乏時においては、Arg、Glu を除くアミノ酸で平均 0.6 倍の蓄積量であった。

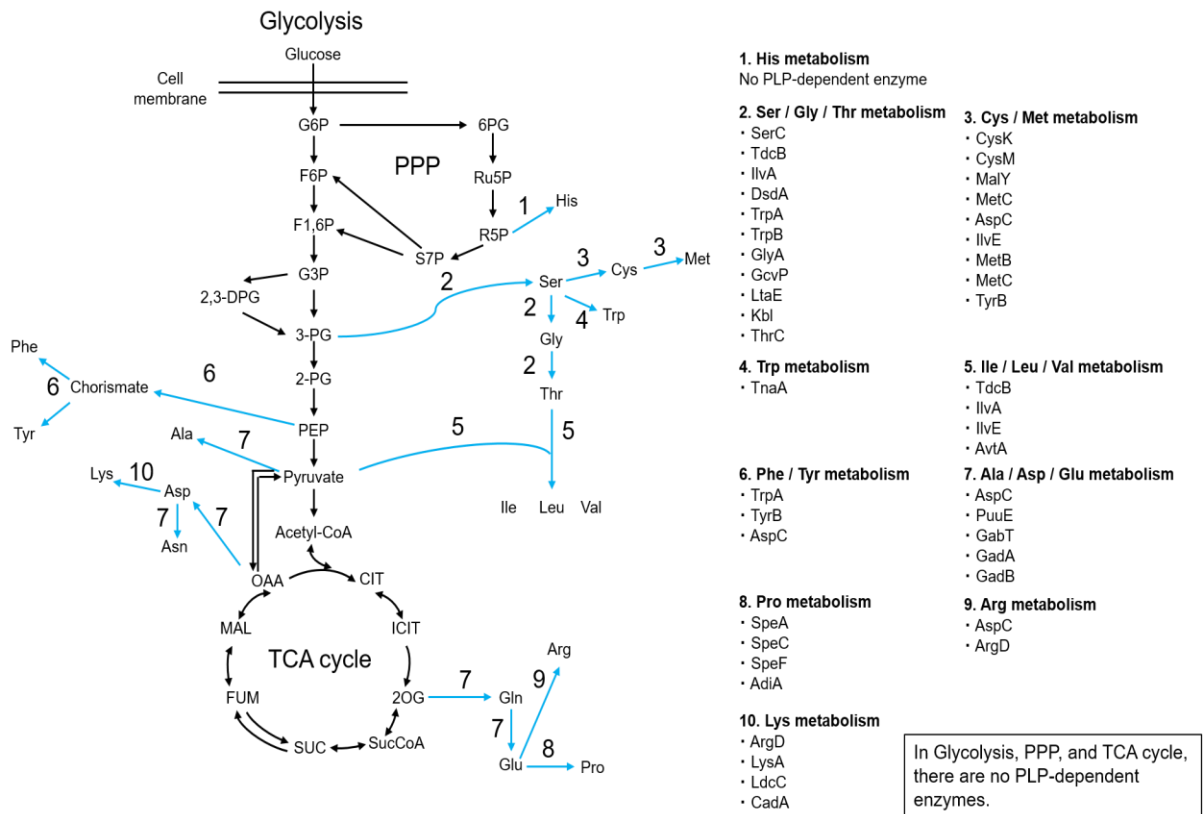
さらに解糖系や TCA cycle 等の代謝経路においても影響が生じることが確認されたことから、PLP 蓄積・欠乏による影響はアミノ酸代謝だけではなく、非特異的に様々な酵素の活性に影響を与えることが示唆された（表 4.3.1、表 4.3.2、図 33 および 図 34）。

PL 添加による PLP 蓄積が引き起こす増殖開始の遅延、および、*ybhA* 遺伝子過剰発現により引き起こされる PLP 欠乏による増殖阻害が、アミノ酸源として採用したカザミノ酸の添加でどのような影響が生じるか増殖測定を行った際、カザミノ酸添加により、これらの表現型が著しく緩和される結果を得た（図 31 および図 32）。これらの結果から、PLP 蓄積 / 欠乏による増殖開始遅延 / 増殖阻害はアミノ酸代謝の異常を引き起こしアミノ酸の恒常性が崩壊されたことに起因する、すなわち増殖開始にはアミノ酸の恒常性が極めて重要であることを示唆している。

大腸菌野生株における解糖系、ペントースリン酸経路、そして TCA cycle および各アミノ酸生合成 / 分解経路を触媒する酵素が PLP 依存か調べた結果、解糖系、ペントースリン酸経路、そして TCA cycle では PLP 依存酵素は無かった。その一方で、His を除く全てのアミノ酸生合成 / 分解経路においては PLP 依存酵素が存在した（図 36）。PLP 蓄積および欠乏時、pyruvate、Acetyl CoA の細胞内濃度変動の挙動が異なる（図 33 (A)、表 4.3.1 および表 4.3.2）。これらの結果から、PEP を Pyruvate へと変換する Pyruvate kinase PykA、PykF およびその逆反応を触媒する PpsA、Oxaloacetate を PEP へと変換する Pck およびその逆反応を触媒する Ppc の酵素活性もしくは遺伝子発現制

御に PLP 恒常性の崩壊が影響を及ぼしていることを示唆している。すなわち、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA cycle においてもアミノ酸代謝の恒常性は重要であると考えられる。それに加えて、PLP 蓄積が解糖系などの代謝経路にも影響を及ぼした原因として、PLP が持つアルデヒド基に由来する非特異的な酵素等への相互作用が考えられる。

本研究では PLP 蓄積による増殖開始の遅延がアミノ酸の恒常性を崩壊させることであることを示すことができた。しかし、最大の目的であった機構までは解明することができなかった。その理由として、大腸菌において PLP 要求性酵素は約 60 あることから、PLP の蓄積による影響が副次的に積み重なるからであることが考えられる (Percudani and Peracchi, 2003, Prunetti et al., 2016)。



(KEGG pathway、BRENDA、Ecocyc より作図)

図 36 解糖系、ペントースリン酸経路、TCA cycle および各アミノ酸代謝経路を介在する PLP 酵素

解糖系、ペントースリン酸経路、TCA cycle (黒矢印) においては PLP 依存酵素は存在しなかった。また、His を除く全てのアミノ酸代謝 (青矢印) に関する PLP 依存酵素を示す。図中番号は、右部各代謝経路毎の PLP 依存酵素リストと同一である。

参考文献

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **62**, 293–300.
- Castillon, N., and Coyle, K. (2011). Tetracycline Modulates the Valine Induced Stringent Response and Decreases Expressed RpoS in *Escherichia coli*. *J. Exp. Microbio. Immun.*, **15**, 117–124.
- Colinas, M., Eisenhut, M., Tohge, T., Pesquera, M., Fernie, A. R., Weber, A. P. M., and Fitzpatrick, T. B. (2016). Balancing of B₆ vitamers is essential for plant development and metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell*, **28**, 1–15.
- Fitzpatrick, T. B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., Tews, I., and Raschle, T. (2007). Two independent routes of *de novo* vitamin B₆ biosynthesis: not that different after all. *Biochem. J.*, **407**, 1–13.
- John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81–96.

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., and Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.*, **12**, 291–9.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria Culture Medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736–747.

Prunetti, L., El Yacoubi, B., Schiavon, C. R., Kirkpatrick, E., Huang, L., Bailly, M., El Badawi-Sidhu, M., Harrison, K., Gregory, J. F., Fiehn, O., Hanson, A. D., and De Crécy-Lagard, V. (2016). Evidence that COG0325 proteins are involved in PLP homeostasis. *Microbiol.*, **162**, 694–706.

Saito, N., Robert, M., Kochi, H., Matsuo, G., Kakazu, Y., Soga, T., and Tomita, M. (2009). Metabolite profiling reveals YihU as a novel hydroxybutyrate dehydrogenase for alternative succinic semialdehyde metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **284**, 16442–51.

5. まとめ

アミノ酸代謝に関与する酵素の活性制御を担う補酵素 Vitamin B₆ (PLP) に関する研究は、その重要性から古くから行われ膨大な知見が蓄積されてきた (Fitzpatrick et al., 2007; John, 1995)。PLP の欠乏による増殖阻害は、細胞の生育に影響を及ぼすことが明らかにされている (Dempsey and Pachler, 1966; Gospe, 2009; Musayev et al., 2009; Oka et al., 1993)。その一方で、*in vitro* 系において過剰な PLP が酵素の不活性化する現象の報告はあるものの、PLP 蓄積による細胞への影響は報告がなく、またその機構に関しても未知であり、これまで 4'位アルデヒド基による非特異的な酵素との反応が原因であると推測されていた (Hisao and Claudio, 1981; Ripa et al., 1967; Surtees et al., 2006; Vermeersh et al., 2004)。

本研究では、大腸菌を用いて培養液中への PL 添加により PLP の蓄積が増殖の開始の遅延を引き起こす現象を見出した (図 18 および 図 19)。さらに、カザミノ酸添加により PLP 蓄積による増殖の開始遅延が抑圧されたことから、アミノ酸代謝の異常に起因することを明らかにした (図 31)。メタボローム解析による細胞内代謝産物の分析の結果、細胞内 PLP の蓄積によりアミノ酸の蓄積および減少が観察されたことから、PLP 蓄積による増殖開始の遅延がアミノ酸代謝異常によるものであることが示唆された (図 34)。実際、*Bacillus megaterius* 由来のグルタミン酸生合成酵素を材料として行われた既往研究により、過剰な PLP がその酵素活性を著しく阻害することを報告されているが、生理的影響に関する知見は未だ報告がなかった (Hemmila and Mantsala, 1978)。従って、本研究は初めて細胞内 PLP の過剰蓄積による生理的影響の観察に成功し、その機構に関しても詳細は未だ未解明ではあるが、アミノ酸の恒常性崩壊に由来することを明らかにしたものである。

上述のとおり、PLP の欠乏だけでなく、蓄積もまた細胞増殖阻害を示すことは、PLP の恒常性が生理的に極めて重要であることを示唆している。このため、PLP 新規合成、サルベージ経路において最終反応を触媒する PL/PM/PN kinase PdxK および

PNP/PMP oxidase PdxH は、PLP による負のフィードバック制御を受けることで PLP の合成は制御されている (図 14) (Ghatge et al., 2012; Zhao and Winkler, 1995)。それに加え、PLP 脱リン酸化酵素による細胞内 PLP 濃度の減少は、PLP 恒常性を維持するための機構として捉えることができるだろう。本研究では、PLP 蓄積を解消する系として PLP 脱リン酸化酵素のスクリーニングを行い、細胞内で様々な代謝産物を脱リン酸化することから生理的機能が未知であった *ybhA* 遺伝子が、PLP の恒常性維持に関与することを初めて明らかにした (図 23 および 図 24)。従って、本研究の遂行により機能未知脱リン酸化酵素であり、fructose-1,6-bisphosphatase としてアノテーションされていた YbhA は生理機能は PLP 脱リン酸化による PLP 恒常性の維持であることを提案する (図 35)。

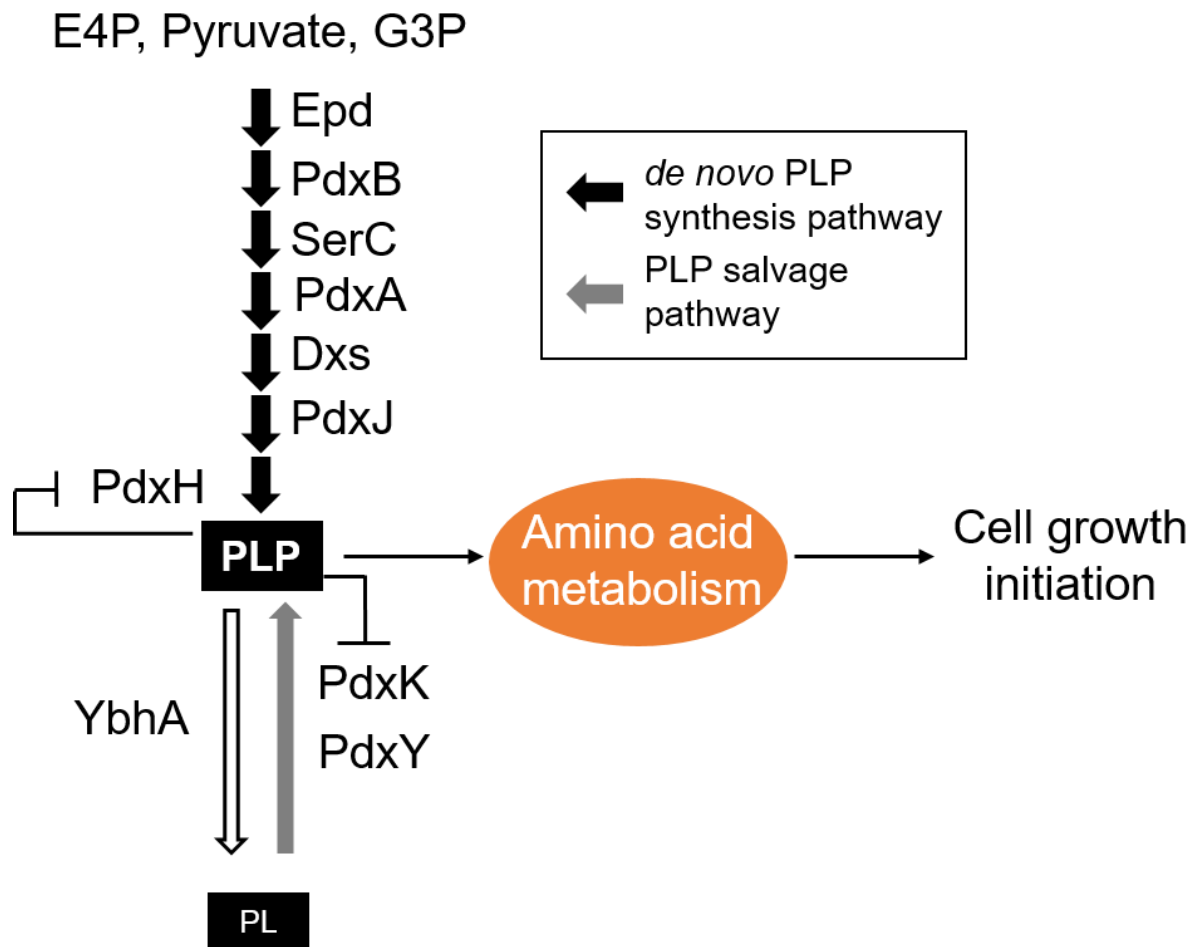


図 35 本研究から考察される生理的な PLP 恒常性の意義および PLP 脱リン酸化酵素 YbhA による PLP 恒常性への関与

本研究から PLP の欠乏および蓄積は増殖開始の遅延を引き起こす（図 17 および 図 23）が、カザミノ酸添加によりそれらの表現型が消失することから、PLP 恒常性の崩壊はアミノ酸代謝の異常を招き、アミノ酸恒常性をも崩壊させることで増殖開始の遅延が引き起こされることが明らかとなった。そのため PLP の恒常性は厳密に制御されており、これまでに PLP 生合成の最終反応を触媒する PdxH および PdxK が PLP により直接的な負のフィードバック阻害を受けることが明らかにされている（Ghatge et al., 2012; Zhao and Winkler, 1995）。さらに、新たに YbhA が PLP 脱リン酸化酵素として、PLP 恒常性の維

持に關与することを明らかにした。略称: E4P; Erythrose 4-phosphate、G3P; Glyceraldehyde 3-phosphate.

参考文献

Dempsey, W. B., and Pachler, P. F. (1966). Isolation and characterization of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **91**, 642–645.

Fitzpatrick, T. B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., Tews, I., and Raschle, T. (2007). Two independent routes of de novo vitamin B₆ biosynthesis: not that different after all. *Biochem. J.*, **407**, 1–13.

Ghatge, M. S., Contestabile, R., di Salvo, M. L., Desai, J. V., Gandhi, A. K., Camara, C. M., Florio, R., González, I. N., Parroni, A., Schirch, V., and Safo, M. K. (2012). Pyridoxal 5'-Phosphate is a Slow Tight Binding Inhibitor of *E. coli* Pyridoxal Kinase. *PLoS One*, **7**, 16–19.

Gospe, S. M. (2009). Neonatal vitamin-responsive epileptic encephalopathies. *Chang Gung Med. J.*, **33**, 1–12.

Hemmilä, I. A., and Mantsala, P. I. (1978). Inactivation of Glutamate Dehydrogenase and Glutamate Synthase from *Bacillus megaterium* by Phenylglyoxal, Butane-2,3-dione and Pyridoxal 5'-Phosphate. *Biochem. J.*, **173**, 53–58.

Hisao, O., and Claudio, G. (1981). Structure-function Relationship in *Escherichia coli* Initiation Factors. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4905–4912.

John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81–96.

Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I., Carmel, L., Wolf, Y. I., Mori, H., Savchenko, A. V., Arrowsmith, C. H., Koonin, E. V., Edwards, A. M., and Yakunin, A. F. (2006). Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J. Biol. Chem.*, **281**, 36149–36161.

Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Saavedra, M. A., Contestabile, R., Ghatge, M. S., Haynes, A., Schrich, V., and Safo, M. K. (2009). Molecular basis of reduced pyridoxine 5'-phosphate oxidase catalytic activity in neonatal epileptic encephalopathy disorder. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30949–30956.

Oka, T., Komori, N., Kuwahata, M., Sassa, T., Suzuki, I., Okada, M., and Natori, Y. (1993). Vitamin B₆ deficiency causes activation of RNA polymerase and general enhancement of gene expression in rat liver. *FEBS Lett.*, **331**, 162–164.

Rippa, M., Spanio, L., and Pontremoli, S. (1967). A Specific Interaction of Pyridoxal 5'-Phosphate and 6-Phosphogluconic Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 48–57.

Surtees, R., Mills, P., and Clayton, P. (2006). Inborn errors affecting vitamin B₆ metabolism. *Future Neurol.*, **1**, 615–620.

Vermeersh, J. J., Christmann-Franck, S., Karabashyan, L. V., Femandjian, S., Mirambeau, G., and Der Garabedian, P. A. (2004). Pyridoxal 5'-phosphate inactivates DNA topoisomerase IB by modifying the lysine general acid. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5649-5657.

Zhao, G., and Winkler, M. E. (1995). Kinetic Limitation and Cellular Amount of Pyridoxine (Pyridoxamine) 5'- Phosphate Oxidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **177**, 883–891.

報文目録

Sugimoto, R^{*}, Saito, N., Shimada, T., and Tanaka, K., (2016). Identification of YbhA as the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) phosphatase in *Escherichia coli*: Importance of the PLP homeostasis on bacterial growth. *J. Gen. App. Microbiol.*, *in press*

参考文献

Niwa, T^{*}, **Sugimoto, R**^{*}, Watanabe, L., Nakamura, S., Ueda, T., and Taguchi, H. (2015). Large-scale analysis of macromolecular crowding effects on protein aggregation using a reconstituted cell-free translation system. *Front. Microbiol.*, **6**, 1113. *: co-first author

巻末

各種培地組成

LB 液体培地

Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Polypeptone	10 g
dH ₂ O	1 L
<hr/>	
Total	1 L

↓

オートクレーブ (120 °C, 15 min) で滅菌処理を行った。

M9 液体培地

KH ₂ PO ₄	0.6 g
Na ₂ HPO ₄	2.56 g
NH ₄ Cl	0.2 g
NaCl	0.1 g
dH ₂ O	200 mL
<hr/>	
Total	200 mL

↓

オートクレーブ (120 °C, 20 min) で滅菌処理を行った。

↓

1 M CaCl₂ : 20 μL, 1 M MgSO₄ : 200 μL, 40 % D-グルコース : 1 mL、40 % Casamino acid
4 mL を加えた。

10 × MOPS 液体培地ストック

MOPS	41.86 g
Tricine	3.59 g
dH ₂ O	180 mL

↓

上記混合液に、10 M KOH を滴下し、pH=7.4 に調整した。

↓

dH₂O で 220 mL にメスアップし、そこに 用時調整した 0.01 M FeSO₄·7H₂O 5 mL を添加した。①

①に対し、以下の化合物を添加した。

Component	Volume
1.9 M NH ₄ Cl	25 mL
0.276 M K ₂ SO ₄	5 mL
0.02 M CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.125 mL
2.5 M MgCl ₂	1.05 mL
5 M NaCl	50 mL
Micronutrient	0.1 mL
dH ₂ O	up to 500 mL

なお、Micronutrient は以下の組成に則り調整した。

Component	Grams for 50 mL
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.009
H ₃ BO ₃	0.062
CoCl ₂	0.018
CuSO ₄	0.006
MnCl ₂	0.04
ZnSO ₄	0.007

10 × MOPS 最少培地ストックは、使用時には 滅菌した dH₂O で 10 倍に希釈し利用した。この時、オートクレーブで滅菌処理した炭素源、および、K₂HPO₄ (終濃度 1.32 mM) を添加した。

LacZ レポーターアッセイ試薬組成

Z buffer

Na ₂ HPO ₄	4.914 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	4.2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1876 g
KCl	0.573 g
β-mercaptethanol	2.0 mL
dH ₂ O	upto 700 mL

0.02 % SDS

10 % SDS	100 μL
dH ₂ O	upto 50 mL

10 × PBS (-)

NaCl	80.02 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	28.97 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
dH ₂ O	600 mL

↓

10 N NaOH を加え、室温で pH = 7.4 に調整した。

↓

dH₂O で 1.0 L にメスアップした。

↓

オートクレーブ (120°C、20 min) で滅菌処理を行った。

4 mg mL⁻¹ ONPG

ONPG	0.2 g
1 × PBS (-)	50 mL

1 M Na₂CO₃

Na₂CO₃

105.99 g

dH₂O

upto 1.0 L

謝辞

5年間という長きに渡り、私を迎え受けて下さり、常日頃から本研究を気にかけて有意義な議論だけでなく、より良い研究へと方針を示して下さいました田中寛教授に、厚く御礼申し上げます。

また、大変未熟な私のために多くのご指導やご鞭撻だけでなく、研究が行き詰った際に適切な助言をご提供頂きました今村壮輔准教授、島田友裕助教授、小林勇氣助教授、瀧景子博士に心より御礼申し上げます。

メタボローム解析を快く引き受けてくださりデータ解析ならびに有意義な議論をして下さりました斎藤菜摘博士に厚く御礼申し上げます。さらに、東京工業大学の Leading 大学院プログラム、環境エネルギー協創教育院の先生方には、様々な異なる分野の講義をして頂くばかりでなく、国際フォーラム参加の機会、さらには留学するための資金面も援助して頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。留学先である Harvard Medical School におきましては、私を研究室へ迎えて頂きました George M. Church 教授および Barry L. Wanner 博士、米国での研究生活をより実りあるものにしてくれた Church 研究室の皆様、そして米国での生活面、ベクターや大腸菌株の提供、実験手法の伝授と様々な面で大変お世話になりました寺本潤博士、Marc Guell 博士ならびに、Julie Norville 博士に厚く御礼申し上げます。

研究生活面においては、実験手法の助言や議論に御尽力下さりました小林一幾氏、各種試薬の保管場所や実験機器の使い方を御教え頂きました河瀬泰子氏に御礼申し上げます。後輩の皆様には研究室に明るさをもたらして頂き、研究のしやすい環境を作って頂きました。御礼申し上げます。

最後となりますが、大学院への進学および博士課程への進学を認め、生活面を支えて頂きました家族に厚く御礼申し上げます。