

Analyses of Activation Mechanisms of Phosphoketolase in *Enterococcus mundtii* QU 25 : Examination of Protein Phosphorylation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-07-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河瀬, 泰子, 田中, 寛, 門多, 真理子 メールアドレス: 所属:
URL	https://mu.repo.nii.ac.jp/records/1053

乳酸球菌 *Enterococcus mundtii* QU 25 の Phosphoketolase 活性化機構の解析 —酵素タンパク質リン酸化の可能性の検討—

Analyses of Activation Mechanisms of Phosphoketolase in *Enterococcus mundtii* QU 25
—Examination of Protein Phosphorylation—

河瀬 泰子*
Yasuko Kawase

田中 寛†
Kan Tanaka

門多 真理子‡
Mariko Shimizu-Kadota

1. はじめに

石油資源の枯渇や地球温暖化を回避して持続可能な社会を構築するためには、エネルギーだけでなく素材も再生可能でカーボンニュートラルなものが求められている。そのような時代に、石油資源を使用しない「石油非依存型プラスチック」の開発が進められており、再生可能なバイオマスを原料としたバイオプラスチックが注目されている。ポリ乳酸は、植物由来原料から生産される透明度の高い硬質なバイオプラスチックで、弱いながら生分解性も合わせ持つ。現在のポリ乳酸プラスチックは、トウモロコシ、イモ類、サトウキビなどの食糧から取り出したデンプンを酵素の働きでグルコースにし、それを乳酸発酵して得られた光学活性乳酸を重合させて合成している。継続可能な社会を実現するには、食糧と競合するデンプンからの生産ではなく、食用にならないキシランなどの木質系バイオマスから有用物質を生産することが望ましい。

1.1. 乳酸球菌 *Enterococcus mundtii* QU 25

乳酸球菌 *Enterococcus mundtii* QU 25 株 (以下 QU 25 株) は、グルコースだけでなくキシロースを糖源としてもポリ乳酸の原料となる L-乳酸を高純度で発酵できる菌株であり、培養条件によりホモ型乳酸発酵とヘテロ型乳酸発酵に切り替えることができる。表(Table) 1 に示すように、低濃度キシロース(28 g/L)条件下では乳酸に加え、酢酸、ギ酸、エタノールなどが二次代謝産物として作られるが、高濃度キシロース(103 g/L)条件下では高純度の乳酸が二次代謝産物として作られた。これは、高濃度キシロース条件下で培養するとペントースリン酸 (PP)/解糖 (glycolytic) 経路が働いてホモ型乳酸発酵のみが、低濃度キシロース条件下ではそれに加えてホスホクエターゼ (PK) 経路が働いてヘテロ型乳酸発酵も行われていると推定され、更に PK 経路の初期で働く PK の活性の有無がヘテロ乳酸発酵とホモ乳酸発酵の切替えの鍵になっていることが考えられた (Abdel-Rahman et al., 2011)。

* 環境研究所 † 東京工科大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 ‡ 工学部環境システム学科

Table 1 Lactate fermentation with high concentration of xylose by *Enterococcus mundtii* QU 25*

Initial xylose concentration (g/L)	Products(g/L)				PK Activities (U/mg protein)	Presumed Pathways Used for Fermentation
	Lactic acid	Acetic acid	Formic acid	Ethanol		
28	18	1.2	3.0	3.1	17.7±0.4	PK pathway PP/glycolytic pathway
103	89	N.D.	N.D.	1.5	N.D.	PP/glycolytic pathway

43°C, pH7.0 *Modification of Abdel-Rahman *et al.*, 2011
PK, phosphoketolase; PP, pentose phosphate; N.D., Not Detected.

QU 25 のゲノムは主染色体とプラスミド合わせて 3.35 メガ塩基対から成り、キシロースを糖源とした乳酸発酵に必要な、キシロースの取り込みと初期代謝に必要な遺伝子群、ペントースリン酸経路や PK 経路に関わる遺伝子群を持っていることが明らかとなり (Shiwa *et al.*, 2014)、表 1 で推定した代謝経路を用いての乳酸発酵が可能であることが明らかとなった。図 1 に QU 25 の持つ遺伝子を元にした推定代謝経路を示す。

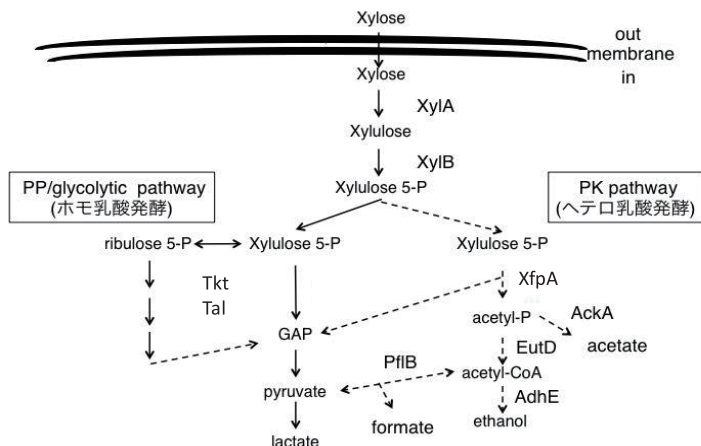


図 1. *Enterococcus mundtii* QU 25 株における推定乳酸発酵経路。

PP/glycolytic pathway; ペントースリン酸解糖経路、PK pathway; ホスホケトラーゼ経路、代謝経路を形成し QU 25 ゲノム上に遺伝子が見いだされる酵素名とその省略形。XylA; キシロースイソメラーゼ、XylB; D-キシロース キナーゼ、Tkt; トランスケトラーゼ、Tal; トランスアルドラーゼ、XfpA; D-キシロルコース 5 リン酸/D-フルクトース 6 リン酸ホスホケトラーゼ (QU 25 の PK)、AckA; アセテートキナーゼ、EutD; ホスホトランスアセチラーゼ、PflB; ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、AdhE; アルコールデヒドロゲナーゼ。

1.2. ホスホケトラーゼ (PK)

PK は、キシロース代謝経路の 1 つである PK 経路中の最上流で働く酵素でキシロース 5-リン酸

(X5P) を基質としており、基質にリン酸を付加してグリセルアルデヒド 3 リン酸 (GAP)、アセチルリン酸、水を生成する反応を触媒する。*Bifidobacterium* 属では X5P に加えてフルクトース 5-リン酸 (F6P) も基質とできる PK が報告され、両者に相同性はあるものの、PK は X5P のみを基質とする XPK グループ、X5P と F6P の両者を基質とする XFPK グループに分けられた。*Bifidobacterium breve* 203 由来の XFPK の結晶構造より、PK はホモ二量体で働くことが明らかとなった (Suzuki *et al.*, 2010)。

ゲノム解析の結果、QU25 株では PK 遺伝子が 1 個見出されており、*xfpA* とアノテーションされた (Shiwa *et al.*, 2014)。続いて、*xfpA* の転写量について解析した結果、培養時のキシロース初濃度の違いで起こるホモ-およびヘテロ-乳酸発酵の切り替えに伴う PK 活性の調節は、*xfpA* の転写レベルではないことを示した (Yanase *et al.*, 2015)。また XfpA は、F6P を基質とは出来ず、そのアミノ酸配列からの類似性からも、アノテーションに反して XFPK ではなく XPK グループに属していた。更に、QU 25 の細胞中では PK 活性の有無にかかわらず XfpA タンパク質はほぼ等量存在し、おそらくはホモダイマーを形成していた (Nabeta *et al.* 2019)。従って、XfpA の活性化機構は翻訳量の調節や、複合体形成の有無によるものでは無いと考えられた。本研究では XfpA の活性化機構として、XfpA の翻訳後修飾としてリン酸化・脱リン酸化の可能性を検討した。

2. 方法

ウエスタンブロット法により解析した。QU 25 株をヘテロ乳酸発酵条件、ホモ乳酸発酵条件で培養した菌体から抽出したタンパク質 10 µg をそれぞれ 10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離泳動した。タンパク質の抽出は脱リン酸化酵素阻害剤 cOmplete, EDTA-free (Roche, Basel, Schweiz) 存在下で行った。その後、ゲル内のタンパク質をポリヴィニリデンダイフルオライド膜に写した後、抗 Phosphoserine (Anti-SerP) 抗体 (Millipore, CA, USA)、抗 Phosphothreonine (Anti-ThrP) 抗体 (Millipore)、抗組換え XfpA (Anti-rXfpA) 抗体 (Nabeta, *et al.* 2019) を用いて結合するタンパク質を検出した (Imamura *et al.*, 2008)。

3. 結果・考察

本研究では、PK 活性化・不活性化に酵素タンパク質の修飾の可能性を検討するため、シグナル伝達制御における普遍的な翻訳後修飾として知られているリン酸化に着目した。主にセリン、スレオニン残基において、可逆的タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は非常に重要性が高いためである。まず、QU 25 ゲノム中にタンパク質のリン酸化や脱リン酸化を行う酵素遺伝子があるかどうかを調べた。

Table 2 Genes Annotated as Protein kinase and Protein Phosphatase on the QU 25 Chromosome.

Feature ID	Position of Start Codon on the Chromosome (base pairs)	Sense Strand	No of Amino Acids	Predicted Gene-Product by Annotation
protein kinases				
EMQU_1712	1793114	-	258	tyrosine-protein kinase transmembrane modulatorEpsC
EMQU_2631	2699467	-	259	protein kinase
EMQU_2724	2825465	-	682	serine/threonine protein kinase
protein phosphatases				
EMQU_1558	1620792	-	245	phosphoprotein phosphatase
EMQU_1710	1791666	-	246	protein-tyrosine-phosphatase
EMQU_2725	2827510	-	246	protein phosphatase 2C

その結果、表 (Table) 2 に示すようにリン酸化酵素遺伝子3個、脱リン酸化酵素遺伝子3個を見だし、上記可能性を支持した。

次に、QU 25 株をヘテロ乳酸発酵条件、ホモ乳酸発酵条件で培養した菌体からタンパク質を抽出して電気泳動し、リン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法で解析した。セリン残基がリン酸化を受けたタンパク質を Anti-SerP 抗体で検出した結果を図2aに示す。

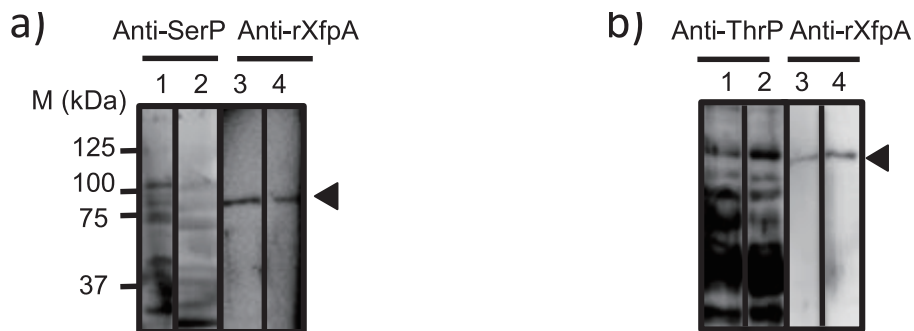


図2 QU 25のヘテロ乳酸発酵条件とホモ乳酸発酵条件における菌体タンパク質のウェスタンブロットティング。

a) 、b)ともレーン1と3はヘテロ乳酸発酵条件、レーン2と4はホモ乳酸発酵条件、a)レーン1と2は Anti-SerP 抗体で検出、レーン3と4は Anti-rXfpA 抗体で検出。b)レーン1と2は Anti-ThrP 抗体で検出、レーン3と4は Anti-rXfpA 抗体で検出。◀ はいずれも89.5 kDaのバンドの位置を示す。

ヘテロ乳酸発酵条件 (レーン1と3) とホモ乳酸発酵条件 (レーン2と4) のサンプルでは、XfpA のタンパク量は (レーン3と4)で変化は無く、XfpA のサイズである 89.5 kDa の大きさのセリン残基がリン酸化を受けているタンパク質を検出できなかった (レーン1と2)。図2b は、スレオニン残基がリン酸化したタンパク質を Anti-ThrP 抗体を用いて検出した結果で、ヘテロ乳酸発酵条件 (レーン1と3) とホモ乳酸発酵条件 (レーン2と4) のサンプルでは、XfpA のタンパク量は a)と同様一定 (レーン3と4)であったが、XfpA のサイズである 89.5 kDa の大きさのスレオニン残基がリン酸化を受けているタンパク質は検出できなかった。

さらに、免疫沈降 (IP: Immuno Precipitation)を行った。IP は、QU 25 細胞からのタンパク質抽出液と Anti-SerP を混合させ、免疫沈降したものを Anti-rXfpA を用いてウェスタンブロット法により解析した。同様に、Anti-ThrP を用いた IP も行った。その結果、各リン酸化抗体に結合でき、かつ、Anti-rXfpAに結合できるタンパク質は検出できなかった (データは示していない)。そのため、XfpA のセリンやスレオニンがリン酸化されている可能性は低く、これらのタンパク質修飾は XfpA の活性化・不活性化に関与している可能性が低いことを示唆している。

QU25 株を高濃度のキシロース条件下で培養した時は、PK の活性がほぼ無いに等しいが、低濃度のキシロース条件下で培養した際には、飛躍的に活性値が上がるため (表1参照)、この切り替えにはダイナミックなタンパク質の調節が必要だと考えられる。今回の実験では、XfpA のセリン・スレオニンのリン酸化は確認できず、XfpA の活性化に関与している可能性が低いことを示唆している。今後、他の翻訳後修飾の可能性や蛋白質全体の変化を調べるため、プロテオーム解析によるアプローチを考えている。

参考文献

Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Hanada K, Shibata K, Sonomoto K. **2011**. Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. *Appl Environ Microbiol* 77:1892-1895.

Shiwa Y, Yanase H, Hirose Y, Satomi S, Araya-Kojima T, Watanabe S, Zendo T, Chibazakura T, Shimizu-Kadota M, Yoshikawa H, Sonomoto K. **2014**. Complete genome sequence of *Enterococcus mundtii* QU 25, an efficient L-(+)-lactic acid-producing bacterium. *DNA Research* 21:369-377.

Suzuki R, Katayama T, Kim B-J, Wakagi T, Shoun H, Ashida H, Yamamoto K, Fushinobu S. **2010**. Crystal structures of phosphoketolase: Thiamine diphosphate-dependent dehydration mechanism. *J Biol Chem* 285:34279-34287.

Yanase H, Araya-Kojima T, Shiwa Y, Watanabe S, Zendo T, Chibazakura T, Shimizu-Kadota M, Sonomoto K, Yoshikawa H. **2015**. Transcriptional regulation of xylose utilization in *Enterococcus mundtii* QU 25. *RSC Advances* 5: 93283-93292.

Nabeta K, Watanabe S, Chibazakura T, Zendo T, Sonomoto K, Shimizu-Kadota M, Yoshikawa H. **2019**. Constitutive Expression of Phosphoketolase, a key enzyme for metabolic shift from homo- to hetero-lactic fermentation in *Enterococcus mundtii* QU 25. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, submitted.

Imamura S, Hanaoka M, Tanaka K. **2008**. The plant-specific TFIIIB related protein, pBrp, is a general transcription factor for RNA polymerase I. *EMBO J* 27, 2317-2327.

謝辞

本研究は物質・デバイス領域共同研究拠点における共同研究により行われた。QU25株のホモ乳酸発酵菌体、ヘテロ乳酸発酵菌体を培養して頂いた、Abdel-Rahman 九州大学客員准教授(現 Al-Azhar 大学准教授)に感謝いたします。