乳酸菌におけるアスパラギン酸脱炭酸とエネルギー生成

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* と減塩醤油の発泡性汚染耐塩性乳酸菌桿菌 *Lactobacillus* 属のある種の菌株はアスパラギン酸をアラニンに変換し、細胞膜を介する物質輸送と共役することによりエネルギー（ATP）を獲得している（脱炭酸的リン酸化）。そこで、著者らにプロテオリポソームを用いた（*Lactobacillus* sp. M3 株の）アスパラギン酸：アラニン交換輸送の機能解析と醤油乳酸菌のアスパラギン酸：アラニン交換体の基質輸送メカニズムを分子レベルで解説いただいた。

七 谷 圭¹・阿 部 敬 悦^{2,3*}

はじめに

醤油醸造で利用される乳酸菌群の中で、ある種の菌株はアスパラギン酸 / アラニン変換能を有することが知られていた。これらの菌株は酸味のあるアスパラギン酸をマイルドなアラニンに変換することから、醤油の香味を改善する優良株として積極的に利用されてきた¹⁾。

細菌においては、古くからアミノ酸や有機酸の脱炭酸反応が知られていた。第1表^{2,3,4)}には、細菌の有機酸、アミノ酸の脱炭酸反応の例を示した。通性嫌気性 Gram 陽性細菌の乳酸菌にも、種々のアミノ酸や有機酸に脱炭酸反応を示す株が存在する。特に食品では、脱炭酸菌による流通過程での汚染が、ガスを発生させ問題となる。さらには、細菌によるアミノ酸の脱炭酸により生じるアミン類は、食品衛生的な見地から問題視される場合もある。反面、ワイン醸造では乳酸菌が原料中の主要有機酸の一つであるリンゴ酸を乳酸と二酸化炭素に変換することにより酸度を低減させる生物学的減酸反応（マロラクティック発酵）が知られており、ワインの酸味と香味の調節に利用されている。こ

第1表 細菌に見出される有機酸、アミノ酸の脱炭酸反応の例

脱炭酸反応（基質 / 生成物）	起源
Arginine/Ornithine	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus sake</i>
Lactose/Galactose	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Oxalate/Formate	<i>Oxalobacter formigenes</i>
Malate/Lactate	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Lysine/Cadaverine	<i>Escherichia coli</i> .
Glutamate/GABA	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus buchneri</i>
Histidine/Histamine	<i>Lactobacillus buchneri</i>
Phenylalanine/Phenylethyl Amine	<i>Lactobacillus buchneri</i>
Tyrosine/Tyramine	<i>Lactobacillus buchneri</i>
Aspartate/Alanine	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Tetragenococcus halophilus</i>
Citrate/Lactate	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Arginine/Agmatine	<i>Escherichia coli</i>

のように、微生物による有機酸、アミノ酸の脱炭酸反応には、人間にとってプラス面とマイナス面があるが、

Aspartate Decarboxylation and Energy Generation in Lactic Acid Bacteria
Kei NANATANI¹, Keietsu ABE^{2,3*}

¹ Laboratory of Applied Biophysical Chemistry, Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

² Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbial Biotechnology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

³ Microbial Genomics Laboratory, New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University

乳酸菌の生理学的な側面からこの反応を見ると、脱炭酸反応が細胞膜を介した物質輸送と共役することによりエネルギー獲得の手段となっている場合があります、これらは総称して脱炭酸的リン酸化と呼ばれている。本解説では、脱炭酸的リン酸化によるエネルギー生成メカニズムについてアスパラギン酸 / アラニン変換系を

例に概説し、本系において中心的な役割を担うアスパラギン酸 / アラニン交換輸送体に関する研究を解説する。

1. 脱炭酸的リン酸化 - proton-motive metabolic cycle -

(1) 脱炭酸反応と菌の生育

脱炭酸反応が細菌に及ぼす効果の例として、生育への影響を述べる。第1図には、減塩醤油におけるアスパラギン酸脱炭酸に伴う発泡性汚染菌として単離された *Lactobacillus* sp. M3 株の、培地中アスパラギン酸の生育への影響を示した。MRS (Glucose-C 源) 培地にアスパラギン酸を添加した場合、M3 株の菌体量はアスパラギン酸非添加区のおよそ 2 倍に増加した。菌の生育にしたがって、添加アスパラギン酸は脱炭酸反応により炭酸ガスの発生（発泡）を伴って、アスパラギン酸 1 モルからほぼ 1 モルのアラニンに変換された。

(2) 脱炭酸反応と細胞内 ATP レベル

第1図で培地へのアスパラギン酸の添加により菌体の増加が観察されたが、予想される反応はアスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基（ β -カルボキシル基）の脱炭酸によるアラニンの生成のみである。この単純な反応で何故、菌体量が増加するのであろうか？

この脱炭酸反応時、菌体内では何が起きているのであろうか？生育の増加が認められたことから、脱炭酸反応がエネルギー生成に寄与している可能性を予想して、アスパラギン酸脱炭酸反応に伴う菌体内の ATP

第1図 アスパラギン酸脱炭酸菌 *Lactobacillus* sp. M3 株の増殖曲線
5% NaCl を含む MRS 培地(control), およびこの培地に 30 mM アスパラギン酸を添加した培地(+ Asp)で *Lactobacillus* sp. M3 株を培養し、生育を比較観察した。

第2表 *Lactobacillus* sp. M3 株のアスパラギン酸脱炭酸反応に共役した ATP 生成

添加物	細胞内 ATP 量 (nmol/mg dry weight)	アスパラギン酸 脱炭酸反応阻害
None	0.3	ND
Aspartate (10 mM)	25.3	無し
Aspartate + DCCD (1 mM)	8.7	無し
Aspartate + nigricine (2 μ M)	0.3	無し
Valinomycin (2 μ M)	0.3	無し
Aspartate + CCCP (2 μ M)	0.3	無し
Aspartate + choline Cl (150 mM)	22.1	無し
Aspartate + Alanine (300 mM)	4.3	有り

洗浄菌体 (0.1 M MES-K, 0.67 M KCl, 40 mg dry cell weight/ml) を 37℃ で 10 分間加温後、10 mM アスパラギン酸を含む同緩衝液に菌体を 10 倍希釈し、さらに 6 分間加温。その後、菌体より ATP を抽出して、ルシフェラーゼを用いて ATP を定量した。ND：測定せず。

レベルの変化を洗浄菌体を用いて調べた（第2表）⁵⁾。その結果、アスパラギン酸のアラニンへの変換に伴って、菌体内のATPの増加が認められた。ここで、このATP生成がアスパラギン酸：アラニン変換に直接共役するのか、間接的に共役するのかという疑問が生じる。ATP生成機構は、代謝過程でATPが直接生成する基質レベルのリン酸化と、細胞膜のF-ATPaseによるpmf（proton motive force）のATPへの変換に大別されるので、アスパラギン酸脱炭酸過程に共役するATP生成に対して、pmfを消失させるプロトノフォア Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) 及びF-ATPase阻害剤N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)の効果を調べた。その結果、CCCP、DCCDはアスパラギン酸の脱炭酸反応は阻害せずにATP生成のみを阻害した。この結果より、アスパラギン酸：アラニン変換とATPの生成は直接共役しているのではなく、アスパラギン酸：アラニン変換がpmfを生成し、そのpmfを用いてF-ATPaseがATPを生成する機構が推定された。また、細胞破碎液を用いた反応ではアスパラギン酸の脱炭酸は起こるが、ATP生成は観察されなかったことから、pmfを維持するための細胞構造-細胞膜構造がATP生成に必要なことを間接的に示唆した。さらに菌体外に高濃度(>300 mM)のアラニンを添加すると、アスパラギン酸の脱炭酸反応が阻害されると共に、ATPの生成が阻害されたことから、アスパラギン酸：アラニン変換（脱炭酸）が菌体外の高濃度アラニンにより阻害され、結果としてpmfが生成せずF-ATPaseによるATP合成が起こらないものと予想された。

2. 脱炭酸的リン酸化の反応機構

それでは脱炭酸によるアスパラギン酸のアラニンへの変換に伴うpmf生成とはどのような機構によるものであろうか？ 阿部らがアスパラギン酸の脱炭酸によるエネルギー生成機構を研究していた時期に、米国のMaloneyらはグラム陰性細菌*Oxalobacter formigenes*のシュウ酸からのギ酸への変換を研究しており、脱炭酸に伴うエネルギー生成機構が提案されたのは、この反応系に端を発する⁶⁾。*O. formigenes*はAllisonらにより牛のルーメンより見出された、シュウ酸を唯一の炭素源として生育し得るグラム陰性細菌である⁷⁾。ある牧場において、シュウ酸を高濃度に含む雑草が生

育し、それを食べた牛がシュウ酸障害により多く死亡した。その中で生存していた牛のルーメンより、*O. formigenes*は見出されたことから、ルーメン内に*O. formigenes*が生育していた牛では、雑草由来のシュウ酸が*O. formigenes*により代謝されて脱炭酸反応でギ酸に変換されることで、シュウ酸障害から免れたことが推定された。本菌がJohns Hopkins大学のMaloney研究室に持ち込まれ、シュウ酸輸送の機構が解析された。Maloneyらはそれまでに大腸菌のグルコース-6-リン酸：無機リン酸のアニオン交換輸送タンパク質を材料にプロテオリポソーム（人工膜小胞）を用いる解析系を確立していた⁸⁾。そこで、Maloneyらは*O. formigenes*シュウ酸輸送とギ酸排出に着目し、両基質の輸送反応をプロテオリポソームを用いて解析した^{6,9)}。Maloneyらはシュウ酸：ギ酸変換系で菌体内ATPの生成を直接確認していなかったが、阿部とMaloneyが*Lactobacillus*のアスパラギン酸の脱炭酸に伴うATP生成のデータを議論した結果、Maloneyらが推定している反応機構と類似の反応によりエネルギー（ATP）を得ている可能性が示唆され、プロテオリポソームを用いた解析を行うことになった。以下、アスパラギン酸：アラニン交換反応を例に輸送過程に伴うpmf生成の機構を解説する。

3. アスパラギン酸：アラニン交換輸送反応の解析

(1) プロテオリポソームを用いた輸送解析

人工膜小胞（プロテオリポソーム）を用いた輸送体と輸送反応の解析は、細胞を用いた輸送過程解析と異なり、輸送反応過程を細胞内の代謝と切り離して解析することが可能であることから、詳細な輸送機構の解析に適している⁸⁾。

プロテオリポソームの作製は、輸送体タンパク質のリポソームへの再構成と呼ばれ、一般に以下の操作で行われる。細胞膜より輸送に関与する膜タンパク質（輸送体）をマイルドな界面活性剤により可溶化し、界面活性剤存在下で過剰量のリン脂質（大腸菌や大豆由来）と混合する。その混合液を大量の緩衝液に対して希釈するか、またはカラム（ゲル濾過、イオン交換）を用いて界面活性剤を除去することで、界面活性剤の濃度が下がるとリン脂質は脂質二重膜より成る膜小胞を形成する。一般的に疎水性のタンパク質である輸送体タンパク質は、膜小胞形成時に脂質二重膜中に

自動的に埋め込まれる。輸送の反応解析のために、小胞形成時の緩衝液に基質をはじめとする種々の物質を添加することで、小胞内側の液組成を制御可能である(基質などの封入)。その後、膜小胞を含む液を10万G以上で超遠心を行ってプロテオリポソームを沈降回収する。回収したプロテオリポソームは種々の緩衝液で洗浄することが可能であり、プロテオリポソーム懸濁液を選択することで、プロテオリポソーム外液組成を制御することが可能である。

輸送反応の解析では、小胞内外の物質の移動を、放射性基質や蛍光基質などで測定する。輸送体の速度論的解析を行う場合には、1プロテオリポソーム当たり2個以上の輸送体が再構成されては、プロテオリポソームの集合体としての速度論的解析が正確に行えないので、1プロテオリポソーム当たりに1個以下の輸送体が再構成されるように再構成時の脂質:タンパク質比を調整する。

(2) アスパラギン酸自己交換反応

ある基質に対する輸送体が存在するか否かの判定には、対象となる基質を高濃度(100 - 200 mM)に封入したプロテオリポソームに対して、外液に低濃度の放射性基質(100-200 μ M)を添加してラベルの取り

込みを測定する。輸送体は自己交換反応によりラベルを取り込み定常状態に達する(counter flow)。この後、外液に非放射性的の基質(10-30 mM)を添加すると、プロテオリポソームに取り込まれた放射性基質の迅速な排出が観察される(exchange reaction)。これら、counter flow と exchange 反応は、輸送反応を触媒する酵素 - すなわち輸送体の存在を示す指標となる。第2図には *Lactobacillus* sp. M3 株由来膜可溶化画分のアスパラギン酸の輸送反応を示した。プロテオリポソームは定常状態に達するまで放射性のアスパラギン酸を取り込み、次いで高濃度の非放射性的のアスパラギン酸を外液に添加するとプロテオリポソームより迅速な放射性基質の排出が観察された。可溶化した膜タンパク質を添加せずに作製した対照区のリポソームでは迅速な基質の自己交換反応は観察されなかった。本実験結果より *Lactobacillus* sp. M3 菌はアスパラギン酸の輸送体(AspT)を有することが確認された⁵⁾。

(3) アスパラギン酸:アラニンの交換反応

次いで、自己交換反応で放射性基質であるアスパラギン酸を取り込んで定常状態に達したプロテオリポソームの外液に非放射性的のアラニンを添加すると、やはり迅速な放射性アスパラギン酸の排出が観察された。

第2図 *Lactobacillus* sp. M3 株のアスパラギン酸:アラニン交換輸送体のプロテオリポソームへの再構成

100mMのアスパラギン酸をプロテオリポソームに封入し、100 μ M [3 H]aspartateを取り込み基質としてプロテオリポソーム外液に添加した。 $\uparrow$: 非放射性的基質の添加 - アスパラギン酸 15 mM(Δ), アラニン 30 mM($\bullet$), 無添加($\circ$), コントロールリポソーム($\blacksquare$)

この結果はアスパラギン酸とアラニンの交換反応が起きていることを示している。すなわち、アスパラギン酸輸送体 (AspT) は、アスパラギン酸:アラニン対向輸送体であることが示唆された。この時、アラニン添加による放射性アスパラギン酸の排出は、非放射性アスパラギン酸添加時のアスパラギン酸排出よりも遅く、時間経過とともに排出が遅くなる。このことは、アスパラギン酸とアラニンの交換が電氣的に不等価(電位差形成的)であることを示唆していた。

アスパラギン酸:アラニン交換反応が電氣的不等価であるという仮定は、両アミノ酸の荷電状態に依存する。すなわち生理的条件に近い pH7 付近では、アスパラギン酸の電荷は -1 ($pK_1[\text{COOH}] = 2.09$, $pK_2[\text{NH}_3^{3+}] = 9.82$, $pK_3[\text{COOH}] = 3.86$) で一方アラニンの電荷は 0 ($pK_1[\text{COOH}] = 2.34$, $pK_2[\text{NH}_3^{3+}] = 9.69$) と考えられ、膜を介した交換反応が起きた場合、膜を挟んで電荷の偏りが発生することになる。そこで、アスパラギン酸:アラニン交換輸送の電氣的不等価交換-電位差形成性を直接確認する実験を行った。第3図には実験の概念図を示した。AspT をプロテオリポソームに再構成する際にアラニン (100 mM) を封入する。この時、プロテオリポソーム内に K^+ (カリウムイオン) 塩で緩衝液や基質を封入したものと、 K^+

とイオン半径の類似しているカチオン N-メチルグルカミン $^+$ 塩として基質・緩衝液を封入したものを作製する。プロテオリポソームの外液には $100 \mu\text{M} [^3\text{H}]$ アスパラギン酸を輸送基質として含む K^+ イオンまたは N-メチルグルカミン $^+$ ベースの反応液を用いる。この反応系に K^+ イオンにのみ選択性のあるイオノフォアであるバリノマイシンを添加する。プロテオリポソーム内に K^+ イオンが存在し、外側に N-メチルグルカミン $^+$ が存在する場合、バリノマイシンの添加によりプロテオリポソーム内から外への K^+ イオンの流出が起こり、膜の内側-負(外側-正)の電位が発生する。逆にプロテオリポソーム内に N-メチルグルカミン $^+$ が存在し、外側に K^+ イオンが存在する場合は、バリノマイシン添加によりプロテオリポソーム内に K^+ イオンの流入が起こり内側-正(外側-負)の膜電位が発生する。電荷 0 のアラニンの外側への移動と共役した電荷 -1 のアスパラギン酸のプロテオリポソーム内への移動は、バリノマイシン- K^+ 系で作られた膜電位に影響されるはずである。この実験の結果は第4図に示した。予想通り、プロテオリポソーム内側負の膜電位発生時には、アスパラギン酸の負電荷と内側負の膜電位の反発によりアスパラギン酸:アラニンの交換は、著しく阻害され、逆にプロテオリポソーム内側正の膜電位では、アスパラギン酸の負電荷がプロテオリポソーム内側正の膜電位に電気泳動的に作用して、アスパラギン酸:アラニンの交換輸送が加速された。この結果は、AspT によるアスパラギン酸:アラニン交換反応が電氣的不等価反応-電位差形成的であることを示している。

第3図 バリノマイシン- K^+ 系を用いたアスパラギン酸:アラニン交換輸送の膜電位への応答実験の概念図

AspT: アスパラギン酸:アラニン交換輸送体; Val: バリノマイシン; K^+ : カリウムイオン; Asp^{-1} : アスパラギン酸(pH 7 で net charge -1); Ala^0 : アラニン(pH7 で net charge 0); K^+ をプロテオリポソームの内側か外側のみに存在させ、バリノマイシンを添加すると、 K^+ の濃度勾配に従いバリノマイシンが K^+ を輸送し、膜電位が発生する。 Asp^{-1} : Ala^0 交換は電氣的に不等価な交換なので、膜電位内側正で加速、内側負で減速される。

(4) エネルギー生成の反応機構

Lactobacillus sp. M3 菌の L-アスパラギン酸-4-脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.12) はピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) 要求性で、その活性は細胞質に局在し、膜画分にはほとんど存在しない。プロテオリポソーム解析の結果、*Lactobacillus* sp. M3 菌の細胞膜にアスパラギン酸:アラニンの電位差形成的交換輸送を触媒する輸送体 AspT の存在が示唆された。AspT によるアスパラギン酸:アラニンの電位差形成的交換反応が続くと、アスパラギン酸の取り込みの共役エネルギーとなる細胞内のアラニンの濃度が高いとしても、細胞内負の膜電位が蓄積し、やがて交換反応は停止するはずで

第4図 アスパラギン酸：アラニン交換の電位差形成性
 プロテオリボソーム，リボソームには100 mM アラニンをN-メチルグルカミン-リン酸緩衝液(△，□，■)またはリン酸カリウム緩衝液(○)で封入。プロテオリボソームおよびリボソームは100 μM [³H] アスパラギン酸を含む100 mM SO₄²⁻100 mM リン酸-カリウム塩緩衝液(△)またはN-メチルグルカミン塩緩衝液(○，□，■)に133倍になるように希釈した。反応系はpH7。バリノマイシン添加は+Val，無添加は-Valで示した。コントロールリボソームはリボソーム内がアラニン+N-メチルグルカミン緩衝液-外部リン酸緩衝液バリノマイシン存在下でアスパラギン酸輸送を確認したが輸送活性を示さなかった。

ある。ところが，細胞においては細胞膜に存在するF-ATPaseがこの膜電位を利用してATPを合成することで，膜電位を消去しこの反応を継続させていると考えられる。反応機構を一般化した概念図を第5図に示した。アスパラギン酸は-1の負電荷を有して細胞内に取り込まれる。このアスパラギン酸輸送の共役エネルギーは，取り込まれたアスパラギン酸が細胞内で脱炭酸されて生じるアラニンの細胞外へ向けての濃度勾配である（細胞内のアラニン濃度は脱炭酸酵素により高く維持されている）。細胞内でアスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基が脱炭酸反応で離脱すると，その部位には細胞内のプロトンが入りアラニンが生成する。アラニンはAspTを経由してアスパラギン酸と交換で細胞外に排出される。この時のアラニンの排出を通じて，細胞内のプロトンが細胞外へ排出されたことになる。結果として，アスパラギン酸（電荷-1）の細胞内の移動とアラニン（電荷0）の交換で細胞内負の膜電位が発生する。さらに，アスパラギン酸の細

胞内での脱炭酸反応では，細胞内プロトンの消費を伴うアラニン生成とアラニンの細胞外への輸送で，実質的に細胞内プロトンが細胞外へ移動したことになり細胞内アルカリ化（プロトンの化学的勾配形成）が起こる。これはpmfの発生そのものであり，F-ATPaseはpmfを用いてATPを合成する。同様にシュウ酸：ギ酸変換系では電荷-2のシュウ酸から電荷-1のギ酸への変化で膜電位が発生し，細胞内の脱炭酸反応で細胞内プロトンが消費され，ギ酸排出で細胞内アルカリ化（プロトン勾配）が起こる。

この反応はより，一般化が可能であり，以下のように整理される（第5図参照）。

- (i) 反応は基質[電荷-n]の取込み→基質の脱炭酸→脱炭酸産物[電荷-(n-1)]の排出から成る。
- (ii) 基質：脱炭酸産物交換過程毎に細胞内に[-1]の負の電荷が移動し，内側負の膜電位($\Delta\psi$)が形成される。

第5図 脱炭酸的リン酸化反応

細胞内外の濃度勾配を駆動力に基質 $[-n]$ が取り込まれ、細胞内で脱炭酸酵素により産物 $[-(n-1)]$ と CO_2 が生じる。生成した産物は、膜輸送体又は自由拡散により細胞外へ輸送される。細胞内での脱炭酸により H^+ が消費され、産物として細胞外へ移動するため、系全体で H^+ ポンプの働きをしている。また、産物と前駆体の電荷が異なるために膜電位が形成される。細胞膜に存在する $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ はこれらの pmf を ATP に変換する。

- (iii) 細胞内での基質の脱炭酸に伴い、基質よりカルボキシル基が離脱した部位に細胞内のプロトン1個が化学的に結合して細胞外へ運ばれることから、細胞内アルカリ化するなか、膜を介したプロトン勾配 (ΔpH) が形成される。
- (iv) 生成した膜電位 ($\Delta\psi$) とプロトン勾配 (ΔpH) の総和である pmf ($=\Delta\psi - Z\Delta\text{pH}$) は、膜に存在する $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ により ATP 合成に利用される。
- (v) 基質取込みの駆動力は対向輸送基質である脱炭酸産物の細胞内から外への濃度勾配であり、細胞内代謝系が輸送共役エネルギーを維持する。
- (vi) 炭酸ガスが細胞外へ自由拡散するために反応は非可逆的である。

以上の一連のサイクル反応を Proton-motive metabolic cycle と呼び、それに伴う ATP を脱炭酸的リン酸化 (Decarboxylative phosphorylation) と定義している²⁾。

4. アスパラギン酸：アラニンの交換体 (AspT) の構造と基質輸送メカニズム

アスパラギン酸 / アラニン変換反応の分子レベルで

の解析は、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* を用いて進められた。同株は、*Lactobacillus* sp. M3 と同様にアスパラギン酸を脱炭酸してアラニンを生成する性質を持ち、産業的にも利用されている菌株である。キュアリング解析により、その性質が約 25kbp のプラスミド pD1 にコードされていることが確認され、塩基配列が明らかにされた。アスパラギン酸 / アラニン変換反応を担う遺伝子は、アスパラギン酸-4 脱炭酸酵素 (AspD) をコードする *aspD*、とアスパラギン酸：アラニン交換輸送体 (AspT) をコードする *aspT* 遺伝子であり、両遺伝子は *aspD* → *aspT* の順で一つのオペロン (*asp* オペロン) を構成していた (第6図 a)¹⁰⁾。この結果より、アスパラギン酸の脱炭酸に続く、アスパラギン酸：アラニン交換輸送により細胞膜を介して細胞内負 (細胞外正) の膜電位が発生し、これを細胞膜に存在する $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ が ATP に変換することでエネルギーが獲得されるという、一連のメカニズムが明らかとなった (第6図 b)。近年のゲノム解析の進展により、同様のオペロンが、*Lactobacillus acidophilus* のゲノム上に存在することが分かっている。*L. acidophilus* は、酸性条件下 (pH4-5) で生育する乳酸菌であることから、グルタミン酸 / GABA

(a)

(b)

第6図 アスパラギン酸脱炭酸に共役したエネルギー生成機構

Tetragenococcus halophilus *asp* オペロンの遺伝子構造(a)とアスパラギン酸脱炭酸のリン酸化によるエネルギー生成メカニズム(b)。●: ターミネーター, AspD:L- アスパラギン酸-4-脱炭酸酵素, AspT:L- アスパラギン酸:L- アラニン交換輸送体

変換系と同様に、酸耐性への寄与が推察される。また、アラニン生産菌として産業利用されている *Comamonas testosteroni* から AspD, AspT をコードする *aspD*, *aspT* 遺伝子が単離されており、興味深いことにこれらの遺伝子は *T. halophilus* *asp* オペロンとは逆の *aspT* → *aspD* の順でオペロンを構成していた¹¹⁾。AspT は Saier らが構築したトランスポーター分類 (Transporter Classification) システムにおいて二次性トランスポーターに分類され、Aspartate : Alanine Exchanger (AAE) ファミリーという新規のファミリーを形成している。

(1) AspT の細胞膜における二次構造

はじめに、AspT とレポータータンパク質 (アルカリフォスファターゼ [PhoA], β-ラクタマーゼ [BlaM]) との融合タンパク質を用いる Fusion 法、部位特異的変異により導入したシステイン残基と修飾試薬との反応性を調べる Cysteine Scanning 法を用いて

AspT の細胞膜上での二次構造の解析を行った^{12, 13)}。本解説では、Cysteine scanning 法による解析を中心に解説する。

Cysteine-scanning 法は部位特異的変異導入と部位特異的化学修飾を融合した手法であり、親水的環境にあるシステイン残基のみが SH 基修飾試薬と効率的に反応することを利用した構造と機能の解析手法である。膜不透過性 SH 基修飾試薬や膜透過性 SH 基修飾試薬を組み合わせることで、膜タンパク質の細胞膜における二次構造の解析、基質透過経路などの解析が可能となる。

Cysteine-scanning 法によって AspT の二次構造を解析するため、ヒスチジntagを導入し、さらに3つの内在性システイン残基を全てアラニンに置換した変異体 *cysless*-AspT-(His)₆ (以下 *cysteine-less* 体) を作製し、この変異体が輸送活性を保持していることを確認した。この *cysteine-less* 体を親株とし、任意のアミノ酸残基を1残基ずつシステイン残基に置換し

た single cysteine AspT-(His)₆ (以下 single cysteine 置換体) シリーズを作製した。大腸菌を用いてこれらの変異体を発現させ、膜不透過性蛍光 SH 基修飾試薬 Oregon Green 488 maleimide (OGM) 及び、膜不透過性 SH 基修飾試薬 [2-(trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate bromide (MTSET) を作用させることで、導入したシステイン残基の細胞膜における位置を推定した。二次構造の解析には、基質輸送に必要な構造を確実に維持している変異体として、cysteine-less 体の比活性を 100% としたとき 30% 以上の相対比活性を保持した変異体を用いた。各変異体のラベルパターンにより、Ala³, Thr⁵⁹, Lue¹⁵¹, Ser¹⁵⁶, Pro¹⁶⁰, Ser³⁸⁶, Ser⁴⁴⁸ 及び Ser⁵⁴³ の残基はペリプラズム側に露出している事が分かった。また、Ser³³, Ala⁹⁰, Met¹⁸², Met¹⁸⁶, Leu¹⁹⁰, Ala¹⁹⁴, Ser²⁰¹, Ser³⁵⁶, Tyr⁴⁰⁸, His⁴¹², Ser⁴²¹, Thr⁴⁷³, Met⁴⁸⁰, Ser⁴⁸⁶ 及び Ser⁵¹⁰ の残基は細胞質側に露出している事が示唆された。以上の結

果から、AspT は N-, C- 末端をペリプラズム側に持ち、10 本の膜貫通 α -ヘリックス (TM) を有し、TM5-TM6 間に約 180 アミノ酸から成る親水性のループ領域を有しているなど AspT が他に類を見ないユニークな分子構造 (第 7 図) を持つことが分かった¹³⁾。

(2) 親水性ループドメインの分子構造

PhoA-, BlaM-fusion 法, Cysteine-scanning 法を用いた二次構造解析によって得られた AspT の構造において最も特徴的な構造は、TM5-TM6 間に存在する約 180 アミノ酸残基からなる大きな親水性のループ領域である。現在までに 60 種類あまりの細菌類から約 90 の AspT オルソログが見出されているが、これらのトランスポーターの多くが中央に同様の親水性ループ構造を持つことが、推定アミノ酸配列からの二次構造予測により示唆されており、AAE ファミリーに属するトランスポーターの特徴的な構造ということがで

第 7 図 Cysteine scanning 法による AspT の二次構造モデルと親水性ループ領域のモデリング構造

上図：各 Single Cysteine 置換体を発現させた大腸菌を膜不透過性蛍光システイン修飾試薬 OGM で処理した場合にラベルされたアミノ酸残基を白色で、破碎後に OGM で処理した場合にラベルがされた変異体を黒で示した。

下図：FAMS により作成した中央の親水性ループ領域の立体構造モデル。各ドメインの立体構造モデルを濃い灰色で、テンプレートとして使用したタンパク質の立体構造を薄い灰色で示した。

きる。アミノ酸配列からドメイン構造を予測するプログラム InterProScan Sequence Search により、この領域には、TrkA_C ドメインと呼ばれるドメイン構造が1つあることが予測された。TrkA_C ドメインは、 K^+ の輸送制御を担うタンパク質 TrkA において最初に見出されたドメイン構造であるが、現在までのところ、その機能は明らかにされておらず、何らかのリガンドが結合し輸送制御に関わっているのではないかと推定されている。これまでに報告されている二次性輸送体の中に、このように輸送制御に関わると推定されるドメイン構造を同一タンパク質分子内に持った輸送体の報告例はなく、AspT におけるこの領域の構造と機能は非常に興味深い。そこで、親水性ループ領域のみを大腸菌を用いて発現・精製し Circular Dichroism (CD) スペクトルを測定した。その結果、親水性ループ領域はランダムな構造ではなく、 α -ヘリックスと β -シートを含んだ高次構造を形成していることが示唆された。

さらに詳細な構造情報を得るため、北里大学薬学部梅山英明教授らのグループの開発したタンパク質立体構造予測プログラム Full Automatic Modeling Sys-

tem (FAMS) により、この親水性ループの三次元構造をモデリングした。モデリングによりループ内には、2つの alpha-beta complex structure (第7図、ドメイン1, Val²⁰⁸-Phe²⁷⁷; ドメイン2, Thr²⁸³-Gln³⁵²) が存在することが分かった¹³⁾。親水性ループの前半部分ドメイン1は、アミノ酸配列から TrkA_C ドメインと推定された領域であるが、後半部分はアミノ酸配列からは TrkA_C ドメインとは推定されなかったのにも関わらず、構造的には類似の構造を保持していた。

(3) 基質輸送メカニズム

AspT の10本の膜貫通 α -ヘリックスのうち3番目の膜貫通 α -ヘリックス (TM3) には、疎水性ヘリックス中に荷電性残基であるアルギニン残基が存在し、さらに AAE ファミリーに属するトランスポーターで保存されている残基が多数存在するなどの点から、基質透過経路を形成するヘリックスの一つであると推定し、TM3に位置するアミノ酸残基を1残基ずつシステイン残基に置換した single cysteine 変異体を作製し、OGM を SH 基修飾試薬として用いて Cysteine-scanning 法により解析した。

第8図 第3膜貫通 α -ヘリックス(TM3)における Asp 結合による OGM ラベリングパターンの変化

TM3 に位置する各アミノ酸残基のシステイン置換体を OGM で処理し、蛍光を検出した。ペリプラズム側の親水性領域に位置する Gly⁶² のシステイン置換体はアスパラギン酸非存在下のみでラベルされた。一方、細胞質側の親水性領域に位置する Pro⁷⁹ のシステイン置換体は、アスパラギン酸存在下のみでラベルされた。

各変異体を発現させた大腸菌から調製した膜画分を Asp を含んだ緩衝液と含まない緩衝液、それぞれに懸濁し、OGM 修飾反応を行った。導入したシステイン残基が、細胞質側、ペリプラズム側のどちらかに露出している場合、OGM による修飾反応が起き、OGM の蛍光が検出される。TM3 には、ペリプラズム側と細胞質側それぞれに Asp の存在下、非存在下で修飾パターンの変化する残基が存在していた（第8図）。G62C は、Asp 非存在下では OGM による修飾を受けるが、Asp の存在下では修飾を受けなかった。一方、P79C は Asp 非存在下では修飾されなかったが、Asp 存在下では修飾された。つまり、ペリプラズム側に位置する G62C は Asp 非存在下では OGM による修飾を受けるが存在下では受けず、逆に細胞質側に位置する P79C は Asp 存在下でのみ修飾された。以上の結果は、AspT が基質である Asp との結合により構造変化を起こし、ペリプラズム側に開口していたものが細胞質側に開口した構造に変化したことを意味しており、AspT が基質との結合により構造変化を伴うことを示唆している¹⁴⁾。

5. Proton-motive metabolic cycle の多様性

第1表に示された脱炭酸反応系は、類似の機構による反応サイクルを構成していると思われる。この反応系の多くは PLP を補酵素に要求する脱炭酸酵素と、基質：産物の交換反応輸送体の二成分で構成されることが多いが、*O. formigenes* のシュウ酸：ギ酸変換系では脱炭酸反応は、oxalyl-CoA decarboxylase (OxC) と formyl-CoA transferase (FrC) の二酵素を必要とする¹⁵⁾。また、*Leuconostoc masebteroides* のクエン酸 (Hcit2-) : 乳酸 (lac-) 変換系 (CitP) ではクエン酸→オキザロ酢酸→ピルビン酸→乳酸と3段階の酵素反応を経る系も存在する^{3,16,17)}。クエン酸代謝に関する詳細は、Lolkema らの優れた総説があるので、参考にしていただきたい³⁾。現在では、Proton-motive metabolic cycle の考えが拡張され、代謝基質取り込み系→内部代謝系→代謝産物排出系の一連の反応で、内部代謝が複数の反応ステップで構成されていても、net として膜電位あるいはプロトン勾配が発生すれば、細胞はエネルギーを獲得し得るという理解に達している³⁾。さらに内部代謝が複数の酵素反応に依存する場合、基質輸送体と反応産物排出体が独立した輸送シス

テムにより触媒される例も明らかになってきている³⁾。

しかし、基質輸送と産物排出が1種類の交換輸送タンパク質により触媒されかつ内部代謝が一段階の酵素反応の例のように、構成酵素・反応ステップ数が少ない場合には、反応サイクルが細胞内の他の代謝の影響を受け難く、基質輸送の駆動力を維持する上で有利であると思われる。

おわりに

微生物を利用した物質生産（発酵）には、例えば有機酸・アミノ酸などの一次代謝産物や抗生物質などの二次代謝産物の生産がある。発酵においては一般に目的物質生産のために極端な代謝制御を行う。過度な代謝制御は、逆にエネルギー供給代謝系の制御を困難とし、菌体内のエネルギーレベル（ATP など）が低下して、生産物収量のさらなる改善の限定要因となることが多い。そこで、種々の産業微生物に対して遺伝子組換え手法により導入可能で、他の代謝系には影響されず且つ目的物質生産代謝系にも影響を与え難い、エネルギー生成系の探索が望まれている。本稿で紹介した PMC は、最小単位として、細胞内脱炭酸酵素と基質：産物対向輸送体があれば機能する非常にコンパクトな系である。少ない構成酵素数のために細胞内の他の代謝の影響を受け難く、反応産物が基質取り込みの駆動力を供給する自己完結型－隔離系である。さらに脱炭酸で CO₂ が膜を通して自由拡散することで、反応が実質的に非可逆的である。以上、PMC は遺伝子組換えにより比較的簡単に種々の細胞種に組み込み可能なエネルギー生成系の要素を備えている。

微生物においては、多岐にわたるトランスポーターファミリーの存在が知られている。トランスポーターは、微生物にとって生理的に重要な役割を果たすだけでなく、原料（前駆体）を菌体内への取り込み、製品（代謝産物）を菌体外へと排出する役割を担っていることから、アミノ酸をはじめ発酵法によって製造されている物質のほとんどは、その製造過程でトランスポーターを介して細胞膜を透過していることになり、産業的にも非常に重要である。実際に、産業微生物である *C. glutamicum* は、リジン、アルギニン、スレオニン、セリンなどのトランスポーターを、*Lactobacillus* 属を含めた乳酸菌群は、グルタミン酸、リンゴ酸、ヒスチジンをはじめとして多くのアミノ酸、有機酸類

のトランスポーターを有していることが報告されている^{4, 18)}。1950年代に日本で、*C. glutamicum*を用いた発酵法による製造法が発明されて以来、現在では年間150万トンが製造されているグルタミン酸に関しても、細胞内での代謝反応により生合成された後、どのような仕組みで培地中に排出されるのかは長らく不明であった。しかし、近年、この培地中への排出にグルタミン酸の排出担体が関与していることが明らかにされた¹⁹⁾。また、様々な産業微生物のゲノム解析の進展に伴い、アミノ酸や有機酸をはじめ産業的に有用な物質を基質とするトランスポーターの存在が次々に明らかにされている。

今後、新たなエネルギー生成系の探索や、輸送体タンパク質の構造研究による、より強力なエネルギー供給源となるシステムの設計、各種細胞種への組み込みによって、積極的に細胞内エネルギー流を扱う、Bioenergetic Engineering - 生体エネルギー工学への発想の拡張が、発酵生産の新しい可能性を開くものと期待する。また、トランスポーターをターゲットとした遺伝子工学的、タンパク質工学的な応用研究により、これまでにない新たな効率的物質生産システムの構築が実現されることを期待する。

謝辞

本研究の実施にあたり研究材料を提供いただいたキッコーマン株式会社に深謝いたします。また本研究遂行にあたり、キッコーマン(株)内田金治博士、神戸千幸博士、樋口 猛博士、林 久順氏、白石邦子氏のご支援に感謝いたします。

〈東北大学大学院〉

参考文献

- 1) 内田金治, 神戸千幸: 醬研 13, 251 (1987)
- 2) P. C. Maloney, R. T. Yan and K. Abe : *J. Exp. Biol.* 196, 471-482 (1994)
- 3) J. S. Lolkema, B. Poolman and W. N. Konings (eds) : *Secondary transporters and metabolic energy generation in bacteria.*, Elsevier, Amsterdam (1996)
- 4) W. N. Konings : *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 3-27 (2002)
- 5) K. Abe, H. Hayashi and P. C. Maloney : *J. Biol. Chem.* 271, 3079-3084 (1996)
- 6) V. Anantharam, M. J. Allison and P. C. Maloney : *J. Biol. Chem.* 264, 7244-7250 (1989)
- 7) M. J. Allison, K. A. Dawson, W. R. Mayberry and J. G. Foss : *Arch. Microbiol.* 141, 1-7 (1985)
- 8) S. V. Ambudkar and P. C. Maloney : *J. Biol. Chem.* 261, 10079-10086 (1986)
- 9) K. Abe, Z. S. Ruan, Z. and P. C. Maloney : *J. Biol. Chem.* 271, 6789-6793 (1996)
- 10) K. Abe, F. Ohnishi, K. Yagi, T. Nakajima, T. Higuchi, M. Sano, M. Machida, R. I. Sarker and P. C. Maloney : *J. Bacteriol.* 184, 2906-2913 (2002)
- 11) T. Fujiki, K. Nanatani, K. Nishitani, K. Yagi, F. Ohnishi, H. Yoneyama, T. Uchida, T. Nakajima and K. Abe : *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 85-91 (2007)
- 12) K. Nanatani, F. Ohnishi, H. Yoneyama, T. Nakajima and K. Abe : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 20-26 (2005)
- 13) K. Nanatani, T. Fujiki, K. Kanou, M. Takeda-Shitaka, H. Umeyama, L. Ye, X. Wang, T. Nakajima, T. Uchida, P. C. Maloney and K. Abe : *J. Bacteriol.* 189, 7089-7097 (2007)
- 14) K. Nanatani, P. C. Maloney K. and Abe : *J. Bacteriol.* 191, 2122-2132 (2009)
- 15) H. Sidhu, S. D. Ogden, H. Y. Lung, B. G. Luttge, A. L. Baetz and A. B. Peck : *J. Bacteriol.* 179, 3378-3381 (1997)
- 16) C. Marty-Teyssset, J. S. Lolkema, P. Schmitt, C. Divies and W. N. Konings : *J. Biol. Chem.* 270, 25370-25376 (1995)
- 17) M. Bandell, M. E. Lhotte, C. Marty-Teyssset, A. Veyrat, H. Prevost, V. Dartois, C. Divies, W. N. Konings and J. S. Lolkema : *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1594-1600 (1998)
- 18) A. Burkovski and R. Kramer : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 265-274 (2002)
- 19) J. Nakamura, S. Hirano, H. Ito and M. Wachi : *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4491-4498 (2007)