

難培養微生物 *Leucobactor sp.* ASN212 株のへム生合成能の検証

応用生物科学専攻 生命分子化学講座

木質生命化学 今村 友哉

1. 背景

Leucobacter sp. ASN212 株は *Sphingopyxis sp.* GF9 株が産生する coproporphyrin (Cop.) 類 を生育に要求する難培養微生物である。当研究室の高井は ASN212 株に対する構造活性相関研究の結果から、ASN212 株はへム生合成の中間体として外性の Cop. III を要求することを明らかにした。また遺伝子解析の結果から、ASN212 株の noncanonical へム生合成遺伝子のうち、*hemA*、*D*、*H*、*Q* 遺伝子は完全な配列として存在する一方、*hemB*、*C*、*E*、*Y* 遺伝子には重要アミノ酸残基の置換や配列挿入が存在することが明らかとなった。本研究では先行研究で不完全性が示唆された ASN212 株の HemB, C, E の機能性について、ASN212 株の cell-free extract (CFE) への中間体投与実験、ならびに ASN212 株への酵素投与実験を用いて検証を行った。

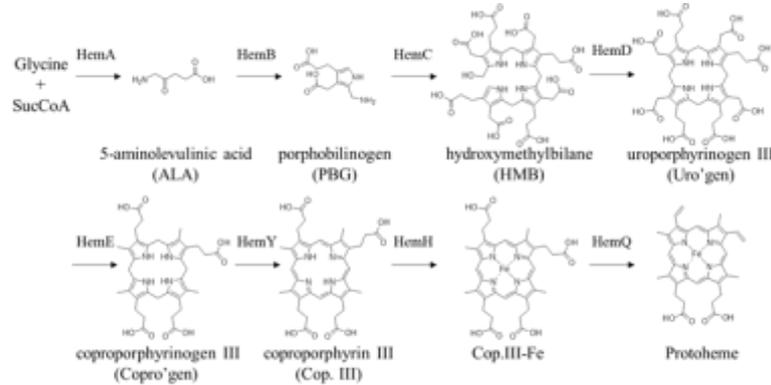


Fig. Noncanonical biosynthetic pathway of protoheme

2. 方法

酵素精製：細菌類由来の HemC 配列を元に hemC 配列を設計し、pGEX-6P-3 中に GST-tag 融合タンパクとしてコンストラクトを調製した。次いで BL21 株を宿主として形質転換し、LB 培地で培養後、IPTG により発現誘導を行った。HemB、D、E については国立遺伝学研究所の ASKA クローンを用いて His-tag 融合タンパクとして調製した。発現誘導後、得られた細胞ペレットより粗酵素液を調製し、次いで対応するアフィニティークロマトグラフィーで目的酵素を精製した。LC/MS による標的物質の探索：最終濃度 25 nM の Cop. III を含む NPB 培地で ASN212 株を 4.5 L 培養後、細胞を回収し、細胞破碎を経て CFE を得た。次いで CFE に 5-aminolevulinic acid (ALA)、porphobilinogen (PBG) をそれぞれ添加した後 37°C にて 8 h インキュベートした。得られた反応溶液を LC/MS に供した。ASN212 株に対する酵素投与実験：精製した各酵素と ASN212 株を 48 穴プレートで 48 h 培養し、OD₅₉₅ で生育量を評価した。

3. 結果・考察

ASN212 株の CFE に ALA を添加した際、PBG, uroporphyrinogen I を示唆する m/z = 210、835 のピークが検出された。しかしながら coproporphyrinogen III、Cop. III に相当する m/z = 661、655 のピークは検出されなかった。この結果より、本菌株は少なくとも HemB, C の機能を保有していることが示唆された。また、ASN212 株に対する酵素投与実験において HemE の投与によって生育量の増加がみられたが、熱処理した HemE を投与した際、生育量の増加はみられなかった。これより HemE は本菌株の生育に寄与していることが示唆された。この結果より本菌株は HemE の酵素機能を失っている可能性が示唆された。