Pseudomonas putidaのL-メチオニン分解系オペロンの解析

誌名	岡山大學農學部學術報告 = Scientific report of the Faculty of Agriculture, Okayama University
ISSN	04740254
著者名	井上,宏之 田村,隆 稲垣,賢二
発行元	岡山大學農學部
巻/号	87号
巻号補足	
掲載ページ	p. 53-58
発行年月	1998年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

Pseudomonas putida のL-メチオニン分解系オペロンの解析

井上 宏之・田村 隆・稲垣 賢二・田中 英彦
(生物資源開発学講座)

Structural Analysis of the *mde* Operon Involved in L-Methionine Degradative Metabolism of *Pseudomonas putida*

Hiroyuki Inoue, Takashi Tamura, Kenji Inagaki and Hidehiko Tanaka
(Department of Bioresources Chemistry)

The *mde* operon and an upstream regulatory gene (*mdeR*) have been cloned and sequenced from *Pseudomonas putida* chromosomal DNA. The *mde* operon contains two structural genes involved in L-methionine degradative metabolism, which are *mdeA* (L-methionine γ-lyase gene) and *mdeB* (a gene encoding a homologous protein to the E1 component of pyruvate dehydrogenase complex). A rho-independent terminator was present just downstream of *mdeB* and open reading frames corresponding to other components of α-keto acid dehydrogenase complex were not found. When the *mdeB* gene product was overproduced in *Escherichia coli*, the E1 activity of the cell extract showed high specificity for α-ketobutyrate rather than pyruvate. These results suggest that *mdeB* encodes a novel E1 component, α-ketobutyrate dehydrogenase E1 component, and plays an important role in the metabolism of α-ketobutyrate produced by L-methionine γ-lyase from L-methionine. In addition, we found that *mdeR* gene was located on the opposite strand and began at 127 bp from the translational start site of *mdeA*. The *mdeR* gene product has been identified as a member of the leucine responsive regulatory protein (Lrp) family and revealed to act as an essential positive regulator allowing the expression of the *mdeAB* operon.

Key words : L-methionine, α-ketobutyrate, *mde* operon, pyruvate dehydrogenase E1 component, leucine responsive regulatory protein

緒 言

L-メチオニンは，含硫アミノ酸の代謝において中心的役割を果たし，生理的に重要な物質に変換されるための様々な経路が存在する．また一方で，ある種の細菌は，L-メチオニンを炭素源や窒素源として効率よく利用するために，動植物など真核生物には存在しないL-メチオニン分解代謝経路を有する[1]．L-メチオニンγ-リアーゼは，細菌のL-メチオニン分解経路において中心的役割を果たし，培地中へのL-メチオニンの添加により誘導発現される誘導酵素である．本酵素は，L-メチオニンのα，γ-脱離反応を触媒し，α-ケト酪酸，メチルメルカプタン，及びアンモニアを生成する．*Pseudomonas putida*[2]，*Aeromonas sp*[3]．由来の本酵素は均一に精製され，その物理化学的，酵素化学的諸性質が明らかにされ

Received October 1, 1997

ている．

一方，L-メチオニンの主要分解産物であるα-ケト酪酸は，主にピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）複合体により酸化的脱炭酸され，プロピオニル-CoAに変換されると考えられていた．しかしグラム陰性菌由来のPDH複合体は，真核生物由来のものと異なりα-ケト酪酸に対する触媒効率が異常に低く（大腸菌由来の酵素はピルビン酸の約1/30の触媒効率[4]），α-ケト酪酸の菌体への蓄積が様々な代謝阻害を引き起こすことも知られている[5]．

我々はこれまでに，*P. putida* 由来のL-メチオニンγ-リアーゼ遺伝子（*mdeA* と命名）を大腸菌にクローニングし，その一次構造を明らかにした[7]．その結果，*mdeA* 遺伝子の3'-下流域にオープンリーディングフレーム（*mdeB*）の一部が見いだされ，両遺伝子がL-メチオニンを分解するためのオペロンを形成している事が示唆された[6]．すなわちグラム陰性菌の中でも，L-メチオニンγ-リアーゼを有する菌は，L-メチオニンから生じたα-ケト酪酸を速やかに分解する未知の経路を発達させていることが予想される．本研究では，完全なL-メチオニン分解系オペロン（*mde* オペロン）をクローニングし，本オペロンにコードされる遺伝子産物及びそれの発現機構について検討した．

材料と方法

使用菌株，プラスミド，及び培地

DNA供与菌として *P. putida* ICR3460を，また宿主菌として *Escherichia coli* DH1及びMV1184を使用した．クローニングベクターにはシャロミド9-28（日本ジーン）を使用した．pUC118/119，pMW218（日本ジーン），及びpET-11a（Novagen）は，遺伝子産物の発現又は塩基配列の決定に使用された．*P. putida* 及び大腸菌の培養は，0.25 %のL-メチオニンを含む培地[2]又はLB培地[7]で37℃または28℃で好気的に行った．*E. coli* の培地には必要に応じてアンピシリン（50 mg/ℓ）又はカナマイシン（50 mg/ℓ）を添加した．

mde オペロンのクローニング

ゲノムライブラリーを作成するために，*P. putida* の染色体DNAを *Bam*HIで切断後，シャロミド9-28にクローン化した．得られた組み換えシャロミド9-28をラムダファージ粒子内にパッケージングし，*E. coli* DH1に感染させた．目的の遺伝子をもつ組み換え大腸菌は，コロニーハイブリダイゼーション法[7]によりスクリーニングした．プローブとして *mdeB* 遺伝子の一部を含む *Pst*I-*Sac*I 272 bpを[α-^{32}P]dCTPで標識したものを用いた（Fig. 1 A）．

大腸菌中での mdeB 産物の発現

mdeB 産物の発現プラスミドを得るために，*lac* プロモーターの支配下，ベクター由来の翻訳開始点から効率よく *mdeB* 産物を生産することができるプラスミドを構築した．まず *mdeB* 遺伝子の推定上の開始コドン部分にPCR法によって *Nde*I制限部位を設けた断片を増幅し，pET-11a中にクローニングした．得られたプラスミドから *mdeB* 遺伝子を含む断

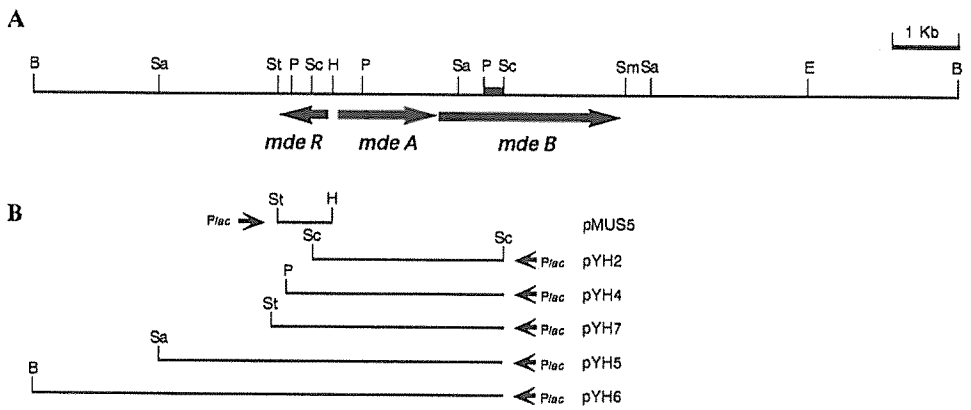

Fig. 1　Restriction map of BamHI fragment of pYH1001 containing the *mde* operon (A) and the fragments used in promoter analysis of the *mdeA* (B).

The positions and directions of transcription of genes are indicated by arrows. The fragment used as a probe for cloning is indicated with a bold line. The directions of transcription by the *lac* promoter are indicated with the short arrows. B, *Bam*HI ; Sa, *Sal*I ; St, *Stu*I ; P, *Pst*I ; Sc, *Sac*I ; H, *Hin*dIII ; Sm, *Sma*I ; E, *Eco*RI.

片を切り出し，pUC119に挿入したものを発現プラスミド pYH1010とした．pYH1010保有 *E. coli* MV1184は，LB培地で培養，集菌後，Buffer A(0.1 mM チアミンピロリン酸及び3 mM 塩化マグネシウムを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2)) に懸濁され超音波破砕された．それを遠心分離した上清を可溶性画分とし，細胞残査は更に Buffer A で2度洗浄後，3000×gで10分間遠心分離し，得られた沈殿を不溶性画分とした．各画分の分析は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により行った．

酵素活性測定法

PDH 複合体 E1 成分及び *mdeB* 遺伝子産物の脱炭酸活性は，2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCPIP) の還元を伴う Lowe らの活性測定法に従った[8]．L-メチオニン γ-リアーゼ活性[2]は，反応後生じた α-ケト酪酸を3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン塩酸塩と反応させて定量した．

結果と考察

mde オペロンの構造解析

コロニーハイブリダイゼーション法によるスクリーニングの結果，*mde* オペロンを含む *Bam*H I 15 kb 断片を含む組み換えプラスミド pYH1001が得られた (Fig. 1A)．本 DNA 断片は，以前にクローニングされていた *mdeA* 遺伝子を含む断片 (Fig. 1B の pYH4 に相当[6]) を完全に含んでいた．塩基配列解析の結果，*mde* オペロンは2つの構造遺伝子 (*mdeA* 及び *mdeB*) からなり，又，本オペロンの127bp 上流において逆方向に調節遺伝子 (*mdeR*) が存在することが明らかにされた．*mdeB* 遺伝子の3'-下流域にはロー因子非依存性のターミネーター構造が見いだされ，本オペロンがここで終結することが示唆された．*P. putida* の総 RNA を用いたノーザン解析の結果，*mdeAB* 遺伝子が同一転写単位であることが明らかにされ，更に培地中の L-メチオニンにより本オペロンが mRNA レベルで誘導を受けることも示された (data not shown)．尚，本オペロンの塩基配列 (Fig. 1A, *Sty* I-*Sma* I 4,707 bp 領域) は，DDBJ, EMBL, GenBank の各 DNA データバンクシステムに登録されている(accession No. D89015)．

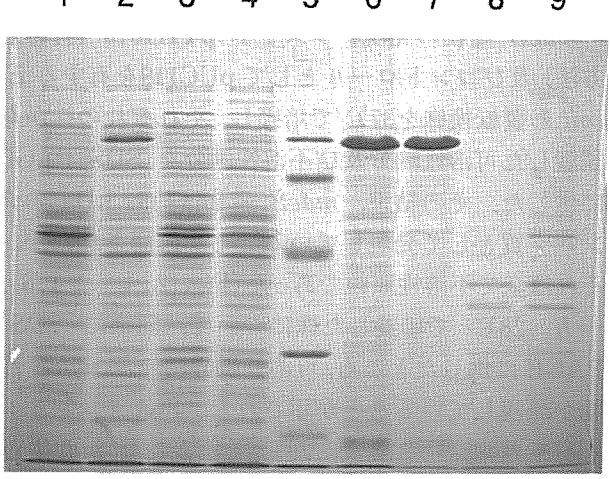

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the cell extracts of *E. coli* transformants.
Lanes 1 to 4 and lanes 6 to 9 indicate soluble fractions and insoluble fractions, respectively. Lanes 1 and 6, *E. coli* MV1184/pYH1010 incubated at 37°C ; lanes 2 and 7, *E. coli* MV1184/pYH1010 incubated at 28°C ; lanes 3 and 8, *E. coli* MV1184/pUC119 incubated at 37°C ; lanes 4 and 9, *E. coli* MV1184/pUC119 incubated at 28°C ; and lane 5, molecular weight standards (top to bottom : 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, and 20.1 kDa).

Table 1 Expression of *mdeB* in *E. coil* MV1184[a]

Substrate	Specific activity (mU/mg)[b]			
	pYH1010		pUC119	
	28°C	37°C	28°C	37°C
α-ketobutyrate	4.80	0.44	0.46	0.96
pyruvate	3.70	3.08	3.28	4.40

[a] *E. coil* MV1184 transformants were grown at 28 or 37°C in LB.
[b] One unit of the enzyme is defined as the amount of enzyme that reduces 1 μmol of DCPIP per min at 30°C.

mdeB 産物の同定

mdeB 遺伝子は，2,673 bp (891アミノ酸)，計算上のサブユニット分子量が98,082のタンパク質をコードしていた．*mdeB* 産物の推定アミノ酸配列は，*E. coli*[9]及び *Alcaligenes eutrophus*[10]由来の PDH 複合体 E1 脱炭酸成分と全領域にわたりそれぞれ50.5 %，53.3 %の高い相同性を示した．又，真核生物やグラム陽性菌由来のそれとは推定上のチアミンピロリン酸結合部位以外に相同性を示さなかった．これらの結果は，*mdeB* 産物がグラム陰性菌特有な PDH 複合体 E1 様脱炭酸活性を示す酵素で

ある事を示唆した.

mdeB 産物の発現プラスミド pYH1010（材料と方法）及びコントロールとして pUC119を有する *E. coli* 形質転換株を37℃ で培養し，それぞれの株から調製した可溶性画分及び不溶性画分を SDS-PAGE に供した．その結果，*mdeB* 産物は約94 kDa のタンパク質として発現していることが確認されたが，それは全て不溶性顆粒であった(Fig. 2，レーン1,6)．一方，28℃ で培養した株について，同様に SDS-PAGE に供したところ，可溶性画分に一部 *mdeB* 産物が発現していることが示された（Fig. 2，レーン2,7)．興味深いことに，28℃ で培養した *mdeB* 産物発現株の可溶性画分は，α-ケト酪酸に対してのみ高い E 1 様脱炭酸活性を示した(Table 1)．又，ピルビン酸に対するその活性は，ほとんど上昇しなかった．従って，PDH 複合体 E 1 脱炭酸成分との一次構造上の高い相同性にも関わらず，*mdeB* 産物は基質特異性も生理的役割も異なる新規の E 1 脱炭酸成分であることが示唆された．すなわち *mdeB* 産物は，L-メチオニンから形成されたα-ケト酪酸の細胞内蓄積を減少させるための重要な役割をもつことが提案される．

PDH 複合体は，E 1 脱炭酸成分，E 2 ジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼ成分，E 3 ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ成分が一定の割合で集合した巨大複合酵素である．このような複合酵素としては，PDH 以外にα-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼや分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体が知られており，それぞれの基質の酸化的脱炭酸を触媒する．これらの複合体の成分遺伝子は通常 E 1，E 2 又は E 1，E 2，E 3 の順でオペロンを形成することが知られている．*mdeB* 遺伝子は，E 1 脱炭酸成分をコードしているにも関わらず，E 2，E 3 成分に相当する遺伝子は確認されなかった．従って，*mdeB* 産物が複合体酵素として機能するためには，E 1 成分のアミノ酸一次構造が似た PDH 複合体の E 2 E 3 成分を拝借している可能性が高い．複合体成分が単独で存在する例は，他にも *A. eutrophus* の PDH 複合体 E 1 様遺伝子 *pdhE*[11] や，*P. putida* のPDH 複合体 E 3 様遺伝子 *lpd3*[12] があり，いずれも生理的役割は不明である．*mdeB* 産物も含め，これら単独で存在する複合体成分は，菌体内外の環境変化に応じて基質特異性や性質の若干異なるアイソザイムとして発現し，既知の複合体成分の一部（全部）を置換することで複合体自身の性質を変化させ，代謝の流れをうまく調節する役割をもっているのかもしれない．

Table 2　Expression of *madeA* in *E. coli* MV1184

Plasmid	Specific activity (mU/mg)[a]	
	LB	Met-medium[b]
pYH 2	ND[c]	ND
pYH 2/pMUS 5	34	24
pYH 2/pMW 219	ND	ND
pYH 4	ND	ND
pYH 7	17	7.8
pYH 5	18	12
pYH 6	17	4.1

[a]One unit of the enzyme is defined as the amount of the enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of α-ketobutyrate per min 37°C.
[b]Medium containing 0.25% L-methionine.
[c]Not detected.

mde オペロンの発現に必須な mdeR 産物の同定

mdeR 遺伝子は，477 bp（159アミノ酸），計算上のサブユニット分子量が17,836のタンパク質をコードしていた．*mdeR* 産物は，Lrp ファミリーと呼ばれる一群の調節タンパク質(*E. coli* 由来 Lrp[13]，*P. putida* 由来 BkdR[14]，*Rhodobacter capsulatus* 由来 PutR[15] など）と約25-40 %の一次構造上の相同性を示し，*mde* オペロンの発現調節に関わる調節タンパク質として作用することが示唆された．*mde* オペロンの発現における *mdeR* 産物の影響を調べるために，本オペロンの5'-上流域を様々な長さに削り(Fig. 1 B)，*E. coli* 中での L-メチオニン γ-リアーゼ活性を調べた．その結果，完全な *mdeR* 遺伝子を含むプラスミド（pYH 5，6，7）を保有する株で活性が観察された（Table 2)．又，*mdeR* 遺伝子を完全に含まない pYH 2 において，pUC119の和合性プラスミドである pMW219に *mdeR* 遺伝子を挿入した pMUS 5 を同時に *E. coli* 中に存在させた時，pYH 2 中の L-メチオニン γ-リアーゼが発現することが示された．これらの結果は，*mdeR* 産物が *mde* オペロンの発現に必須な正の調節因子であり，*mde* オペロンのプロモーター領域と *mdeR* 産物が直接に相互作用することを示唆する．

mde オペロンは，*P. putida* においては L-メチオニンによって誘導される．*P. putida* を用いた *mdeR*

プロモーター活性の研究から，*mdeR* 遺伝子は，培地の成分に関わらず構成的に発現されることが確認された（data not shown）．即ち *P. putida* において，*mdeR* 遺伝子産物は通常は不活性型として存在し，*mde* オペロンの発現を低く押さえるが，L-メチオニンの存在中 L-メチオニンが *mdeR* に作用して活性型となり，*mde* オペロンの発現を促進すると考えられた．又これと類似の機構は，他の Lrp ファミリー調節タンパク質においても既に提案されている[15]．しかしながら，*E. coli* 形質転換株では L-メチオニンによる *mde* オペロンの誘導は観察されなかった（Table 2）．又発現が観察された *E. coli* 形質転換株においても，L-メチオニンを含む培地で培養した *P. putida* での L-メチオニン γ-リアーゼ活性（70-120 mU/mg）に比較して低い活性しか示さない．従って，*E. coli* 内での *mdeR* 産物は常に不活性型として存在，作用していることが示唆される．L-メチオニンが *mdeR* 産物を活性化する直接の調節因子かどうかは，現在のところはっきりしない．また *P. putida* と *E. coli* の RNA ポリメラーゼの違いは *mdeR* 産物との相互作用や発現効率に影響を及ぼす可能性もあり，今後更なる検討が必要である．

要　約

mde オペロン及びその上流調節遺伝子（*mdeR*）が *Pseudomonas putida* 染色体 DNA からクローニングされ，これらの遺伝子の塩基配列が決定された．*mde* オペロンは，L-メチオニン分解代謝に伴われる2つの構造遺伝子 *mdeA*（L-メチオニン γ-リアーゼ遺伝子）及び，*mdeB*（ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の E1 成分に相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子）を含んでいた．ロー因子非依存型のターミネーター構造が *mdeB* のすぐ下流に存在し，α-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の他の成分に相当するオープンリーディングフレームは見られなかった．*mdeB* 産物が大腸菌中で過剰発現されたとき，その細胞抽出液は，ピルビン酸よりもむしろα-ケト酪酸に対し高い特異性を持つ E1 活性を示した．すなわち *mdeB* 遺伝子は新規の E1 成分であるα-ケト酪酸デヒドロゲナーゼ E1 成分をコードしており，L-メチオニンから L-メチオニン γ-リアーゼによって生産されたα-ケト酪酸の代謝に，*mdeB* が重要な役割を果たすことが示唆された．更に我々は，*mdeA* 遺伝子の翻訳開始点から127 bp 上流反対方向にコードされる *mdeR* 遺伝子を見い出した．*mdeR* 産物は，ロイシン応答調節タンパク質（Lrp）ファミリーの一つとして同定され，*mdeAB* オペロンの発現に必須な正の調節因子として作用することが明らかとなった．

謝　辞

本研究は，平成6年度から8年度までの3年間に亙る岡山大学学内特定研究（特殊環境微生物の機能開発と物質生産への応用）を分担して行ったものである．

文　献

1) Soda, K. : Microbial sulfur amino acids : an overview. Methods Enzymol., **143**, 453-459 (1987)
2) Nakayama, T., N. Esaki, K. Sugie, T. T. Beresov, H. Tanaka, and K. Soda. : Purification of bacterial L-methionine γ-lyase. Anal. Biochem., **138**, 421-424 (1984)
3) Nakayama, T., N. Esaki, K. W-J. Lee, I. Tanaka, H. Tanaka, and K. Soda. : Purification and properties of L-methionine γ-lyase from *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem., **48**, 2367-2369 (1984)
4) Bisswanger, H. : Substrate specificity of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **256**, 815-822 (1981)
5) Van Dyk, T. K., and R. A. LaRossa. : Involvement of *ack-pta* operon products in α-ketobutyrate metabolism by *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet., **207**, 435-40 (1987)
6) Inoue, H., K. Inagaki, M. Sugimoto, N. Esaki, K. Soda, and H. Tanaka. : Structural analysis of the L-methionine γ-lyase gene from *Pseudomonas putida*. J. Biochem., **117**, 1120-1125 (1995)
7) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. : Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, N. Y. (1989)
8) Lowe, P. N., F. J. Leeper, and R. N. Perham. : Stereoisomers of tetrahydrothiamin pyrophosphate, potent inhibitors of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. Biochemistry, **22**, 150-159 (1983)
9) Stephens, P. E., M. G. Darlison, H. M. Lewis, and J. R. Guest. : The pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* K12. Nucleotide sequence encoding

the pyruvate dehydrogenase component. Eur. J. Biochem., **133**, 155-162 (1983)

10) Hein, S. and A. Steinbhel. : Biochemical and molecular characterization of the *Alcaligenes eutrophus* pyruvate dehydrogenase complex and identification of a new type of dihydrolipoamide dehydrogenase. J. Bacteriol., **176**, 4393-4408 (1994)

11) Hein, S. and A. Steinbhel. : *Alcaligenes eutrophus* possesses a second pyruvate dehydrogenase (E1). Eur. J. Biochem., **237**, 674-684 (1996)

12) Palmer, J. A., K. T. Madhusudhan, K. Hatter, and J. R. Sokatch. : Cloning, sequence and transcriptional analysis of the structural gene for LPD-3, the third lipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. Eur. J. Biochem., **202**, 231-240 (1991)

13) Willins, D. A., C. W. Ryan, J. V. Platko, and J. M. Calvo. 1991. Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. J. Biol. Chem., **266**, 10768-10774 (1991)

14) Madhusudhan, K. T., D. Lorenz, and J. R. Sokatch. : The *bkdR* gene of *Pseudomonas putida* is required for expression of the *bkd* operon and encodes a protein related to Lrp of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **175**, 3934-3940 (1993)

15) Keuntje, B., B. Masepohl, and W. Klipp. : Expression of the *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein. J. Bacteriol., **177**, 6432-6439 (1995)