



New gene responsible for *para*-aminobenzoate biosynthesis

パラ-アミノ安息香酸生合成に関与する新規遺伝子

(JBB, Vol. 117, No. 2, 178–183, 2014)

佐藤 康治^{1*}・倉都 将宏²・小林 大毅¹・大利 徹^{1*}

葉酸は、核酸やアミノ酸合成に関与する補酵素であり、すべての生物において必須の化合物である。植物や微生物の多くは自ら生合成しているが、ヒトは合成できず食事から摂取している。葉酸はプテリン、パラ-アミノ安息香酸 (pABA)、およびグルタミン酸より構成される。pABA 生合成に関しては、PabABC が関与するコリスミ酸を基質とした生合成経路が知られていたが、我々は、ゲノム配列が公開されている細菌の中には既知 pABA 生合成遺伝子オーソログをもたない株が存在することに気づいた。しかし、それらの中には野生株であっても遺伝子欠損による pABA 栄養要求株も含まれていると考えられる。そこで最初に、乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* については pABA 原栄養性であることを実験的に確認した¹⁾。また亜硝酸菌 *Nitrosomonas europaea* は化学合成独立栄養細菌であるため pABA 原栄養性と考えられた。したがって、両菌株は新規な pABA 生合成経路を有すると予想し、その生合成遺伝子を探索することとした。

目的遺伝子の探索は、pABA 栄養要求性大腸菌の相補を指標としたショットガンクローニングにより行った。宿主には *pabABC* 遺伝子すべてを破壊した大腸菌を用いた。本破壊株は pABA 要求性を示し、最少培地で増殖できない。したがって最少培地で増殖する株は pABA 生合成遺伝子の獲得を意味し、容易にスクリーニングできる。その結果、*L. fermentum* ゲノムを DNA 供与体とした場合には pABA 要求性相補株を得ることはできなかったが、*N. europaea* ゲノムを DNA 供与体とした場合には相補株が十数株得られた。その挿入遺伝子を詳細に解析することにより、*NE1434* 遺伝子が pABA 要求性を相補することを明らかとした。さらに *NE1434* 遺伝子を高発現させた pABA 要求株の培養液を LC/MS 解析した結果、pABA の蓄積が確認された。以上より本遺伝子が pABA 生合成に関与することを証明した。

NE1434 遺伝子は、補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) 生合成遺伝子の一つ *pqqC* に高い相同性を示した。そこで、*pqqC* が pABA 生合成に関与するか検証した。PQQ 合成細菌 *Pseudomonas putida* より *pqqC* 遺伝子をクローニングし、pABA 要求性を相補するか検証した。

しかし *pqqC* 遺伝子では相補されなかった。PQQ 生合成遺伝子は一般的に *pqqABCDEF* の 6 遺伝子から構成されるが、*Nitrosomonas* 属細菌は *pqqC* (*NE1434* 遺伝子) 以外のオーソログをもたないことから、*pqqC* 遺伝子と *NE1434* 遺伝子の機能は異なると結論づけた。

NE1434 遺伝子オーソログは亜硝酸菌を含む *Thaumarchaeota* に属する細菌にも見いだされた。また、偏性細胞内寄生菌である *Chlamydia* 属や *Rickettsia* 属細菌にも存在した。これら細菌も既知 pABA 生合成遺伝子オーソログをもたないため、*NE1434* 遺伝子オーソログが pABA 生合成に関与していると推測された。そこで *Chlamydia trachomatis* の *NE1434* 遺伝子オーソログである *CT610* 遺伝子を pABA 栄養要求性大腸菌に導入した結果、*NE1434* 遺伝子と同様に相補することが確認され、*CT610* 遺伝子も pABA 生合成に関与することが示された。

最後に、*NE1434* 遺伝子産物の機能解明を組換え酵素を用いて試みた。既知 pABA 生合成経路ではコリスミ酸を基質として生合成されるため、コリスミ酸を基質とした *in vitro* 解析を行った。しかし種々の条件を検討したが pABA の生成は確認されなかった。そこで次に、遺伝子破壊株を用いた *in vivo* 解析による基質の推定を試みた。相補実験により、本遺伝子産物は菌体内に存在する代謝物を基質として pABA を生合成していると考えられる。また芳香族化合物は主にシキミ酸経路中間体より合成されるため、その中に *NE1434* 遺伝子産物の基質が存在すると予想した。これを検証するため、先の pABA 要求株からシキミ酸経路の *aroB*、*-C*、および *-D* 遺伝子破壊株をそれぞれ構築し相補試験を行った。しかし、何れの破壊株においても pABA 要求性が相補された。以上の結果より *NE1434* 遺伝子産物はコリスミ酸およびシキミ酸経路中間体を基質としないことが示唆された。この結果は、既知経路とはまったく異なる経路の存在を示唆しており、現在も全容解明に向けて研究を進めている。

1) Kuratsu, M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 7299 (2010).

*著者紹介 ¹北海道大学大学院工学研究院応用化学部門 E-mail: syasu@eng.hokudai.ac.jp, dairi@eng.hokudai.ac.jp

²協和発酵バイオ株式会社