

アミノ酸代謝酵素の機能調節に関する構造生物学的研究

富田 武郎 (東京大学 生物生産工学研究センター)

uttomi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに

アミノ酸はタンパク質の構成成分であると同時に、近年生体調節因子としての機能も注目されている。実際、これまでにグルタミン酸は食品中のうまみ成分として、リジンは家畜飼料として大量に生産され用いられている。最近ではその他のアミノ酸も食品のサプリメントとして利用され、ますますその需要が高まっている。アミノ酸の生理機能や発酵生産の基盤を明らかにすることによって、それらの有効利用に向けた重要な知見が得られるものと考えられる。演者は、微生物由来酵素の解析を通して、哺乳類に共通するロイシンによるグルタミン酸脱水素酵素の調節機構やグルタミン酸の発酵生産の鍵酵素の触媒機構、リジン生合成酵素の機能・調節機構に関する構造生物学的研究を行った。

1. グルタミン酸脱水素酵素の活性調節に関する構造生物学的研究

グルタミン酸脱水素酵素 (GDH)は、NAD(P)(H)を補酵素とし、 α -ケトグルタル酸とグルタミン酸との間の変換を触媒する酵素である (図1)。哺乳類由来の GDH は様々な代謝化合物により複雑な調節機構が存在しており、GTP や ATP, NADH などによる阻害を受け、ADP や NAD^+ , ロイシンなどによる活性化を受けることが知られている。ヒト GDH1 において GTP による阻害の耐性を引き起こす変異は、毒性の高いアンモニアの過剰放出を促すと同時に、インスリン過剰分泌を促すことから、高インスリン/高アンモニア (HI/HA) 血症の原因として特定されている。一方、これまで植物や微生物由来の GDH はアロステリック調節を受けないと考えられてきた。一般に GDH は同一サブユニットからなるホモ6量体であるが、演者は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の GDH が互いに相同性を有するタンパク質である GdhA と GdhB からなるヘテロ複合体を形成するといったユニークな特徴を持つことに加え、ロイシンによって強く活性化を受けることを発見した。

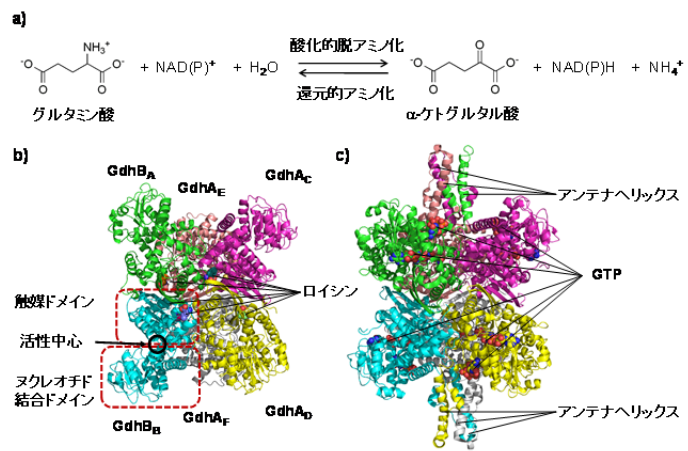


図1 グルタミン酸脱水素酵素(GDH)の反応と結晶構造
a)GDHの反応 b) *T. thermophilus*由来GDHの結晶構造 c)ウシ由来GDHの結晶構造

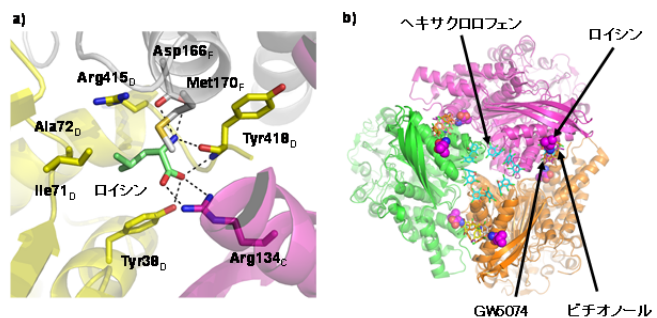


図2 ロイシン結合サイト a)TtGDHのロイシン結合サイト b)TtGDHのロイシン結合サイトとウシGDHのエフェクター結合サイトの重ね合わせ

ロイシンによる活性化機構を明らかにするために、GdhA₄/GdhB₂ヘテロ6量体のロイシン結合型構造を決定することに成功した。それらサブユニット間の境界領域にロイシンが結合していること、同部位へのロイシンの結合がGDHの活性化を引き起こすことを明らかにした。一方、ヒトやウシのGDHとアミノ酸配列を比較したところ、*T. thermophilus*のGDHにおいてロイシン結合に関わるアミノ酸残基が保存されており、これらのGDHもまた同様な機構でロイシンによって活性化される可能性が考えられた。そこで、保存アミノ酸をロイシンが結合できなくなるよう置換したヒトGDH2の変異酵素を作製し、ロイシンに対する感受性の変化を調べたところ、各変異体はロイシンによる活性化能を消失していることがわかった。最近、ウシGDHの阻害剤がケミカルライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングにより得られ、特に強い阻害活性を示したヘキサクロロフェンやGW5074、ピチオノールなどの化合物との複合体の結晶構造が決定された。これらも同じロイシンと同じサブユニット間領域に結合し、特にGW5074やピチオノールはロイシンが結合するサイトのごく近傍に結合する(図2)。これらの阻害剤はGDHの回転数を低下させることからサブユニット間領域に結合する化合物がドメインの開閉を調節するという共通した性質を見出すことができる。以上の結果は、栄養シグナルとして機能するロイシンのセンシング機構の一端を明らかにしただけでなく、哺乳類のGDHの活性化についても重要な情報を提示した。哺乳類のGDHは複雑に制御され、GDH活性の脱制御を与える変異の幾つかは高インスリン/高アンモニア血症の原因と同定されている。本研究の成果は、GDHをターゲットとした創薬開発にもつながるものと期待される。

2. *Corynebacterium glutamicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素の触媒機構の解明

C. glutamicum はグルタミン酸やリジンなどの発酵生産に利用されている。*C. glutamicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素(CgGDH)は高いグルタミン酸合成活性を持つため、グルタミン酸生産の鍵酵素の一つであると考えられている。酵素の補酵素特異性や基質特異性、反応の指向性に関する構造基盤を明らかにすることはグルタミン酸生産に関する知見や、その他のアミノ酸等有用物質の生合成経路を設計するための基盤となるものと期待された。

演者は、CgGDHの結晶構造を1.68 Å分解能で決定することに成功した。CgGDHは他の多くのバクテリア由来のGDHと同様にホモ6量体構造を有していた。6つのサブユニットのうち4つは活性中心が閉じた構造をとり、反応中間体であるα-イミノグルタル酸(α-IG)を結合していた(図3)。この構造は、基質で

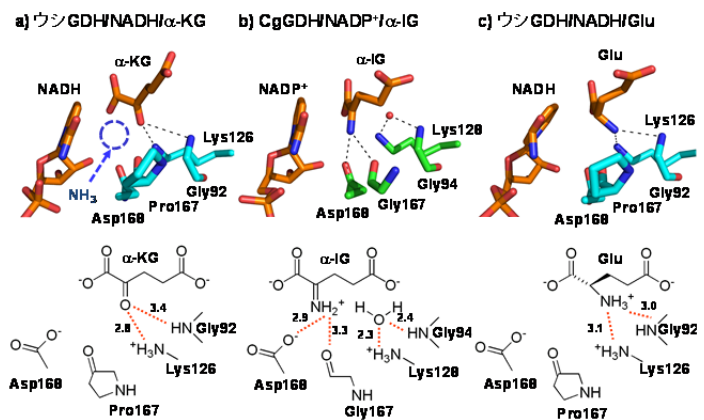


図3 CgGDHとウシGDHの活性中心

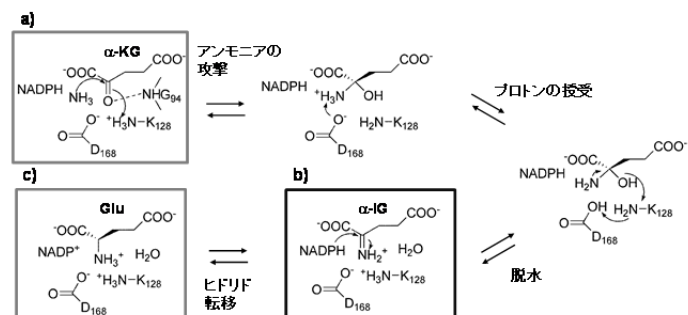


図4 GDHの反応機構 a) ウシGDH/NADH/α-KG, b) CgGDH/NADP+/α-IG, c) ウシGDH/NADH/Glu

ある α -ケトグルタル酸(α -KG)と NAD^+ を結合したウシ由来の GDH の構造に似ていたが、それぞれの酵素間で α -IG と α -KG の結合様式は異なっていた。ウシGDHでは、 α -KGの α -ケト基はGly92、Lys126と水素結合を形成しており、 α -ケト基と NAD^+ の間にアンモニア分子が入りうる空間が存在する。それに対して、CgGDHでは、 α -IGの一部が NADP^+ のニコチンアミド環とスタッキングし、ウシGDHでアンモニアが入ると推定される空間に α -イミノ基の窒素原子が位置しており、反応機構中のヒドリド転移を起こすのに適した配置をとっている。CgGDHの結晶構造から同ファミリーの酵素について提唱されている触媒メカニズムの構造基盤を初めて提示することに成功した(図4)。

3. リジン生合成酵素に関する構造生物学的研究

リジンは一般に、バクテリアではジアミノピメリン酸(DAP)を経由するDAP経路、カビや酵母では α -アミノアジピン酸(AAA)を経由するAAA経路で生合成されることが知られている。ところが近年、高度好熱菌 *T. thermophilus* はバクテリアでありながらAAAを経由する新規な経路でリジンを生合成することが明らかとなっている(図5)。この経路の前半部分はTCA回路の一部やロイシン生合成経路と、後半部分はアルギニン生合成経路と酵素やその反応が類似している。最近、経路の後半が新規なアミノ酸キャリアタンパク質により生合成中間体を保護しながら進むことや³⁾、同様の生合成経路を有し、生命の起源に近縁とされる古細菌ではより少数の基質特異性が寛容な多機能酵素によって複数のアミノ酸生合成を行うことが明らかとなってきており⁹⁾、代謝経路の進化を研究する上での格好の対象であると考えられている。演者はこの経路を構成する酵素のうち初発酵素であるホモクエン酸合成酵素(HCS)⁴⁾、ホモイソクエン酸脱水素酵素(HICDH)の改変酵素(LR5-1)⁵⁾、 α -アミノアジピン酸アミノ基転移酵素(AAA-AT)^{1,2)}の結晶構造を決定し、それらの調節機構や基質認識機構を解明した。また、リジン生合成酵素 LysX のホモログである古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来アルギニン生合成酵素 ArgX とアミノ酸キャリアタンパク質 LysW の複合体の結晶構造を決定し、キャリアタンパク質と基質の認識機構を解明した⁹⁾。これらの成果は酵素の機能設計をするうえでの有用な知見となることが期待される。

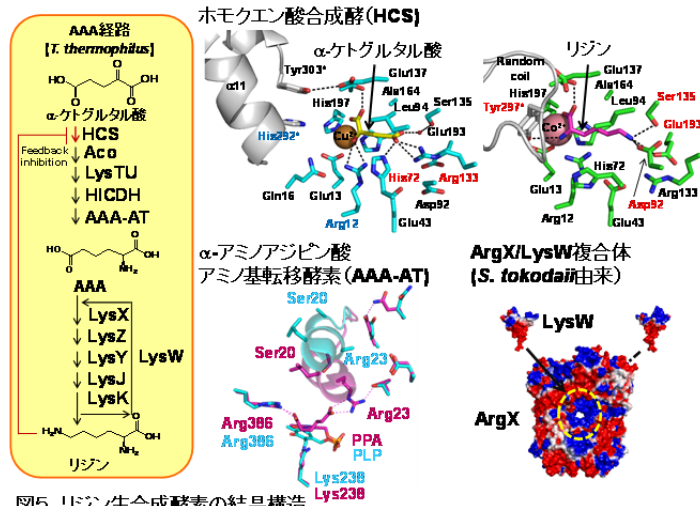


図5 リジン生合成酵素の結晶構造

おわりに

本研究では、*T. thermophilus* 由来の GDH の調節機構を探る過程で、ヒトも同様の機構によりロイシンによる活性化を受けることを明らかにした。今後、*T. thermophilus* をモデルとしてロイシンに対する細胞応答機構の解析を進め、生物にとってのアミノ酸シグナルの生理的意義を明らかにしていきたい。また、GDH をターゲットとしたドラッグデザインが促進されることが期待される。グルタミン酸発酵の鍵酵素の一つである CgGDH やリジン生合成酵素について明らかになった触媒機構や調節機構を利用し、有用物質生産法の開発に貢献できればと考えている。

謝辞

本研究は、東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究室で行われたものです。本研究のご指導、ご支援を賜りました細胞機能工学研究室教授・西山真先生に心より御礼申し上げます。また本研究の成果は、同研究室の方々、共同研究者の皆様、ならびにご支援くださいました皆様方のご協力によるものであり、深く感謝致します。最後に、本賞にご推薦頂きました日本農芸化学会会長・清水誠先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Tomita, T., Miyagawa, T., Miyazaki, T., Fushinobu, S., Kuzuyama, T., and . Nishiyama, M. (2009) Mechanism for multiple-substrates recognition of alpha-aminoacidate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Proteins*, **75**, 348-59.
2. Ouchi, T., Tomita, T., Miyagawa, T., Kuzuyama, T., and . Nishiyama, M. (2009) Dual roles of a conserved pair, Arg23 and Ser20, in recognition of multiple substrates in alpha-aminoacidate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 21-7.
3. Horie, A., Tomita, T., Saiki, A., Kono, H., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2009) Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 673-679.
4. Tomita, T., Okada, T., Wulandari, A.P., Kuzuyama, T., and . Nishiyama, M. (2010) Mechanism of substrate recognition and insight into feedback inhibition of homocitrate synthase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 4195-205.
5. Suzuki, Y., Asada, K., Miyazaki, J., Tomita, T., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2010) Enhancement of the latent 3-isopropylmalate dehydrogenase activity of promiscuous homoisocitrate dehydrogenase by directed evolution. *Biochem. J.*, **431**, 401-410.
6. Tomita, T., Miyazaki, T., Miyazaki, J., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2010) Hetero-oligomeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Microbiology*, **156**, 3801-3813.
7. Tomita, T., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M., (2011) Structural basis for leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **286**, 37406-13.
8. 富田武郎、西山真 (2012) ロイシンによるグルタミン酸脱水素酵素の活性調節機構. 化学 **67**, 72-73.
9. Ouchi, T., Tomita, T., Horie, A., Yoshida, A., Takahashi, K., Nishida, H., Lassak, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Kosono, S., Nishiyama, C., Masui, R., Kuramitsu, S., Albers, SV., Kuzuyama, T., Nishiyama, M. (2013) Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 277-83.

Studies on structural biology of the function and regulation of amino acid metabolic enzymes

Takeo Tomita (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo)

uttomi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp