

アミノ酸合成酵素の機能と調節機構に関する研究

吉田 彩子 (東京大学生物生産工学研究センター)

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

はじめに

細胞内の代謝の恒常性を維持するため、生物は様々な代謝調節機構を有している。タンパク質の構成成分であるとともに、生体調節因子としての機能を持つアミノ酸の生合成においても、遺伝子発現や酵素活性の調節機構が存在する。アミノ酸の多くが微生物を用いて発酵生産されており、その生合成機構や代謝調節機構を理解することで、より効率的な生産が可能になると考えられる。私はアミノ酸を中心とした生合成酵素の調節機構に関して明らかにすることを目指し、アミノ酸発酵菌 *Corynebacterium glutamicum* や高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジンやロイシン生合成酵素に焦点をあて、その調節機構や機能、及び進化について研究を行った。

Corynebacterium glutamicum 由来アスパラギン酸キナーゼ (AK) の活性調節機構の解析

工業的なアミノ酸生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* はリジンの生産に長年用いられてきた。*C. glutamicum* のリジン生合成経路の初発酵素であるアスパラギン酸キナーゼ (AK、以下 CgAK) は、アミノ酸生合成によくみられるように最終産物によるフィードバック阻害を受け、リジンを必要以上生産しないように調節されている。一方でこの性質はリジンの大量生産には不利となることから、リジンアナログである *S*-(2-アミノエチル)-*L*-システイン (AEC) を用いて AK のフィードバック阻害耐性変異株が単離され、さらに育種された株がリジン高生産株として利用されてきた。しかしながら、CgAK のフィードバック耐性機構や AEC 耐性機構は長年の間謎であった。CgAK は AK を初発酵素として作られるリジンとスレオニンがともに存在するときのみ阻害を受け、また触媒ドメインと活性制御ドメインで構成される α サブユニットと、活性制御ドメインである β サブユニットからなる $\alpha_2\beta_2$ 構造をとるといふ、酵素としても興味深い特徴を持つ。このように基礎、応用面で興味深い研究対象である CgAK の活性制御機構を明らかにするため、X線結晶構造解析を行った。

スレオニンのみが結合した活性制御ドメインのみの結晶構造や、リジンとスレオニンが結合した阻害型 (図1) とスレオニンのみが結合した活性型の $\alpha_2\beta_2$ 全長構造を決定することに成功した。構造比較に基づく変異体解析から、CgAK のリジンとスレオニンによる協奏阻害が、スレオニン結合によるヘテロ複合体の安定化と、リジン結合による活性中心付近の構造変化による基質結合の阻害という二段階の構造変化によって生じることを明らかにした。この構造変化により、阻害型では閉じた構造が安定化されていることが分かった (図2)。またこれらに加え、フィードバック阻害耐性 (AEC 耐



図1: CgAKの結晶構造 (阻害型)

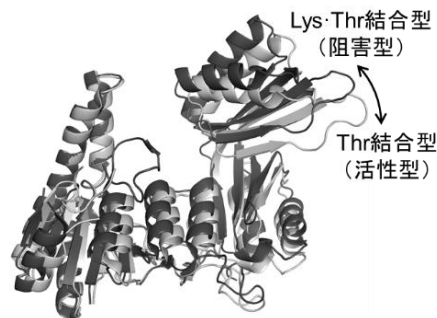


図2: 阻害剤結合による構造変化

性) 変異体のリジン・スレオニン結合型の結晶構造も決定し、AEC 耐性をもたらす変異によって、不活性型の閉じた構造が不安定化することにより、活性型構造が維持されることを示した。以上より、長年の謎であった CgAK の複雑な活性制御機構や AEC 耐性機構を解明することができた^{1,2)}。

さらに、CgAK と同様の $\alpha_2\beta_2$ 構造をもち、スレオニンのみによって阻害を受ける高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の AK (TtAK) についても、その活性制御ドメインの結晶構造を決定した。結晶構造から、スレオニンによる制御機構や CgAK の構造との比較により、TtAK のもつ高い熱安定性の構造的要因を明らかにした³⁾。

アミノ基キャリアタンパク質を用いる新規アミノ酸合成経路の構造機能解析

リジン生合成経路として、アスパラギン酸を初発物質としてジアミノピメリン酸 (DAP) を經由する DAP 経路と、カビや酵母で見られる α -アミノアジピン酸 (AAA) を經由する AAA 経路が一般によく知られる。一方で高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、バクテリアでありながら DAP 経路ではなく、AAA を經由し、LysW と名付けられた小タンパク質が関与する新規な経路でリジンを生合成する。AAA 以降の初発酵素 LysX によって、AAA のアミノ基と LysW の C 末端のグルタミン酸残基の側鎖がペプチド結合により縮合し、それ以降は基質が LysW にロードされたまま生合成反応が進行し、最後に LysW が切り離されることでリジンが生成する。このように LysW は AAA 以降の反応中間体のアミノ基の保護基としてだけでなく、基質を各生合成酵素に運ぶキャリアタンパク質としても働く。このアミノ基キャリアタンパク質 LysW の機能を構造生物学的に明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。その結果、LysW に初発酵素の基質である AAA が付加した LysW- γ -AAA の結晶構造と、これを基質としてリン酸化反応を行うアミノ酸キナーゼ LysZ と LysW の複合体の結晶構造の決定に成功した⁴⁾ (図 3)。得られた構造の表面電荷から、負に帯電した LysW が LysZ の正に帯電した領域と静電的に相互作用していることが明らかとなった。また LysZ 以外の生合成酵素についても結晶構造を決定し、LysW との静電的な相互作用が示唆または確認されている^{5,6)}。このようにキャリアタンパク質が静電相互作用によって各生合成酵素にリクルートされる様子は、脂肪酸生合成酵素等においても観察されており、これがキャリアタンパク質を介する生合成システムとして普遍的な認識機構であることが推察された。

この LysW を用いるリジン生合成経路を構成する酵素は、アルギニン (オルニチン) 生合成の酵素と類似していることから、これらの生合成経路 (酵素) が同一の進化的起源をもつと考えられる。我々は、進化的に生物の共通祖先により近いとされる超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* が LysW を利用してリジンだけでなくオルニチンを生合成し得ること、さらにそれらの生合成には二機能性を持つ 1 組の酵素群が関わることを

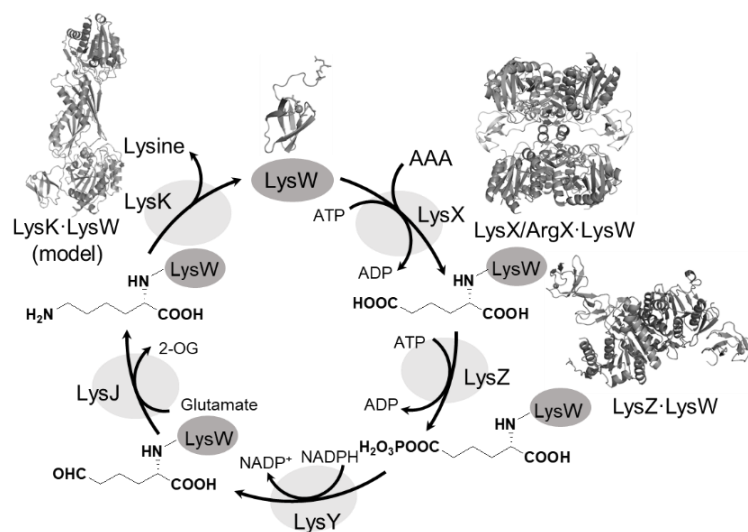


図3: LysWを用いる生合成システム

見出した⁹⁾。代謝経路の進化仮説の一つであるパッチワーク仮説では、始原生物では基質特異性が寛容な酵素群によって複数の化合物が合成されており、その後の遺伝子重複と機能分化によって現存する化合物特異的な生合成経路が出来上がったとされている。*T. kodakarensis* においてリジンとオルニチンが一組の酵素群で生合成され得ることから、始原生物に多機能性を持つ生合成経路が存在していたことを示唆する実験的な証拠を提示できたと考えている。また、*T. kodakarensis* の二機能性を持つリジン・アルギニン生合成酵素 LysX/ArgX のキャリアタンパク質、基質との三者複合体の結晶構造を決定した (図 3)。これにより、生合成酵素の寛容な基質特異性の構造的要因を明らかにし、構造を基に基質結合部位をデザインし、基質特異性を寛容なものから特定の基質に対応するように進化させることにも成功した⁹⁾。

T. thermophilus のロイシン生合成酵素のタンパク質アセチル化修飾による調節機構の解析

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるリジンアセチル化は、真核生物のヒストン修飾の一つとして広く研究されているが、近年核を持たないバクテリアや古細菌においても多くのタンパク質がアセチル化修飾を受けていることが、プロテオーム解析により明らかとなっている。同定されているアセチル化タンパク質には代謝酵素が多く含まれ、アセチル化の基質としてアセチル CoA が、脱アセチル化の基質として NAD⁺ といった代謝における中心的な物質が用いられていることから、タンパク質アセチル化と代謝調節との関連性が示唆されている。*T. thermophilus* は遺伝子数が約 2,000 と比較的少なく、タンパク質も安定で解析しやすいことから、本菌を対象にプロテオーム解析を行ったところ、208 のアセチル化タンパク質を同定した。同定したアセチル化タンパク質には、これまでに報告されている他の生物と同様に、代謝酵素やリボソームタンパク質などの翻訳に関わるタンパク質が多く含まれていた。同定された修飾タンパク質のうちロイシン生合成経路の初発酵素 2-isopropylmalate synthase (IPMS) に着目した。IPMS の活性はロイシンによりフィードバック阻害により活性調節を受ける⁷⁾。IPMS は高濃度のアセチル CoA 存在下で非酵素的にアセチル化されることを見出すとともに、導入されたアセチル基は特定の脱アセチル化酵素により取り除かれることを明らかにした。さらに、IPMS はアセチル化により活性が低下し、脱アセチル化により低下した活性が回復することから、IPMS が可逆的なアセチル化により活性制御を受けることを明らかにした。この IPMS の可逆的なアセチル化による活性調節には、活性発現やロイシンによるフィードバック阻害にも重要なリンカードメイン中の特定のロイシン残基のアセチル化に関わることを明らかにした⁸⁾。本研究により、アセチル CoA を基質として用いる IPMS が、ロイシンによるフィードバック阻害だけでなく、細胞内のアセチル CoA 濃度依存的な翻訳後修飾により活性調節を受けるといふこれまで知られていなかった制御機構の存在を明らかにした (図 4)。これにより、アミノ酸生合成酵素の活性調節機構に対し、翻訳後修飾という新たな概念を提示できた。

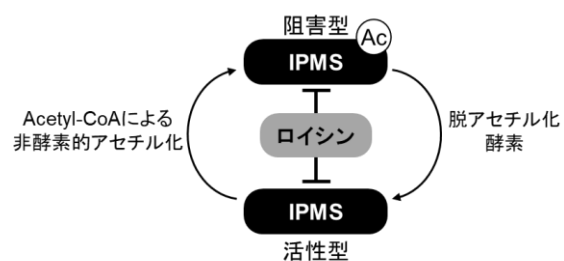


図4: IPMSの活性調節機構

おわりに

私はバクテリアのアミノ酸生合成酵素の機能や活性調節機構に関して、構造生物学や生化学的手法などを用いて取り組み、リジン生合成経路の初発酵素 AK の活性調節機構や、新規キャリア

タンパク質を用いる新たなリジン生合成機構を明らかにした。また、ロイシン生合成の初発酵素である IPMS において、タンパク質アセチル化という新しい活性調節機構を見出した。今後も微生物の持つ多様かつ特徴的な代謝調節機構やその生理的役割について探求することで、本分野のさらなる発展に貢献していきたい。

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及び微生物機能代謝工学研究室にて行われたものです。本研究を行うにあたり多くのご指導、ご支援をいただきました細胞機能工学研究室の西山真教授に心より感謝申し上げます。またタンパク質アシル化修飾研究を始める機会を頂き、ご指導いただきました古園さおり准教授に感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたりご指導ご協力いただきました多くの共同研究者の先生方に感謝申し上げます。また、日頃よりご支援ご協力いただきました、細胞機能工学研究室・微生物機能代謝工学研究室の関係者の皆様に感謝申し上げます。最後になりましたが、本賞にご推薦いただきました、日本農芸化学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Yoshida A., Tomita T., Kurihara T., Fushinobu S., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *J. Mol. Biol.* 368: 521-536 (2007)
- 2) Yoshida A., Tomita T., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *J. Biol. Chem.* 285: 27477-27486 (2010)
- 3) Yoshida A., Tomita T., Kono H., Fushinobu S., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *FEBS J.* 276: 3124-3136 (2009)
- 4) Yoshida A., Tomita T., Fujimura T., Nishiyama C., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *J. Biol. Chem.* 290: 435-447 (2015)
- 5) Fujita S., Cho S. H., Yoshida A., Hasebe F., Tomita T., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491: 409-415 (2017)
- 6) Yoshida A., Tomita T., Atomi H., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *J. Biol. Chem.* 291: 21630-21643 (2016)
- 7) Yoshida A., Kosono S., Nishiyama M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501: 465-470 (2018)
- 8) Yoshida A., Yoshida M., Kuzuyama T., Nishiyama M., Kosono S.: *Extremophiles* 23: 377-388 (2019)