

《農芸化学奨励賞》



微生物 NAD キナーゼの構造と機能に関する研究

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 助手 河井 重 幸

NAD(H) [NAD⁺ と NADH] は、酸化還元反応の補酵素として主に異化反応（エネルギー獲得反応）において機能する。NAD⁺ は、モノおよびポリ ADP リボシル化反応やヒストン脱アセチル化反応などのさまざまな反応にも関与する。一方、NAD(H) がリン酸化されると NADP(H) [NADP⁺ と NADPH] となり、全く異なる機能を担うようになる。NADP(H) は、酸化還元反応の補酵素として主に同化反応（合成反応）や酸化ストレスからの生体防御反応に関与する。

NAD(H) と NADP(H) の生理的な重要性和両者の機能の違いから、NAD(H)/NADP(H) 比の制御の重要性は明白である。この制御の鍵となるのが、NAD キナーゼ (NADK) と NADP(H) フォスファターゼ [NADP(H)ase] である。NADK は、リン酸供与体 [ATP やポリリン酸 (Pn)] を利用してリン酸受容体 NAD⁺ をリン酸化し、NADP⁺ を合成する。NADP(H)ase は、NADP(H) を NAD(H) へと脱リン酸化する。ATP 利用型の NADK は 1950 年に、Pn 利用型の NADK は 1980 年にそれぞれ発見されていた。しかし、NADP(H) の重要性にもかかわらず、遺伝子を含め、両酵素の明確な生化学的・分子生物学的知見が全く得られていなかった。NADP(H)ase に関しては、その実体すら不明であった。

本研究により、NADK と NADP(H)ase の遺伝子が初めて同定され、細胞内 NAD(H)/NADP(H) 量比と多様な生命現象との関係を、構造生物学および分子生物学の観点から研究する基盤が確立された。

1. NADK の同定、機能解析、応用

グラム陽性細菌 *Micrococcus flavus* より、Pn と ATP の両方を利用する Pn/ATP-NADK を分離し、そのアミノ酸配列情報を基に、初めて NADK 遺伝子の同定に成功した。これにより、ゲノム配列既知の真正細菌、真核生物、およびアーキアの NADK の同定ならびに NADK の構造生物学的・分子生物学的研究が可能となった。

まず、多様な微生物 [グラム陽性細菌 (結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*), グラム陰性細菌 (*Escherichia coli*, *Sphin-*

gomonas sp. A1 株), アーキア (メタン細菌 *Methanococcus jannaschii*), 真核微生物 (酵母 *Saccharomyces cerevisiae*)] 由来 NADK の機能解析を行い、NADK のホモ多量体構造や生物分類に対応したリン酸供与体・受容体特異性を明確にした。すなわち、①グラム陽性細菌とアーキアの NADK は、Pn と ATP を利用して NAD(H) をリン酸化する Pn/ATP-NAD(H) キナーゼ [NAD(H)K] であること、②真核生物の NADK は、ATP のみを利用して NAD(H) をリン酸化する ATP-NAD(H)K であること、③グラム陰性細菌の NADK は、ATP のみを利用して NAD⁺ のみをリン酸化する ATP-NADK であることを示した [リン酸受容体特異性の違いを強調するときに、特に NADK と NAD(H)K を区別する] (図 1)。ほかにも、*E. coli* NADK (YfjB) のみが生理的濃度の NADP(H) でアロステリック阻害を受けること、および酵母 NADK 欠損株が致死性を示すことなども示し、細胞内 NAD(H)・NADP(H) 比の制御機構とその生理機能を理解するうえで重要な基礎的知見を得た。さらに、NADK の一次構造のアラインメントにより保存領域 A および B を見いだした。これらの成果は、NADK の構造生物学的・分子生物学的研究を進展させる基盤的知見となっている。

なお、Pn は、オルトリン酸がリン酸エステル結合で縮重合した高エネルギー化合物である。ATP と比較してはるかに安価で、反応副産物 (ADP) が生じない (ATP を用いた場合は反応産物と等量の ADP が生じる)。そこで、結核菌 Pn/ATP-NADK (Ppnk) と Pn を用いた高純度 NADP⁺ の安価な大量生産法を工業化し、物質生産における Pn のエネルギー供与体としての有用性を初めて示した。

2. NADP(H)ase の同定、機能解析

非特異的な NADP(H)ase 活性を示すアルカリフォスファターゼなどの酵素は知られていたが、NADP(H) の脱リン酸化により NAD(H)/NADP(H) 比の制御にかかわる「真の」NADP(H)ase は不明であった。

本研究において、アーキア *M. jannaschii* 由来 NADK

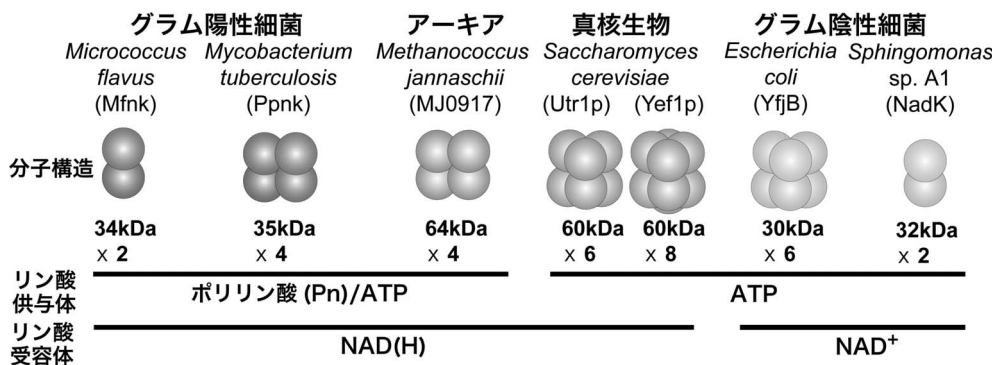


図 1 多様な微生物由来 NADK のホモ多量体構造とリン酸供与体・受容体特異性



図2 Ppnkの立体構造(四量体)
点線囲み; A-A'またはB-B'二量体のサブユニット間の
会合領域。

(MJ0917)がNADK領域とイノシトールモノフォスファターゼ(IMPase)ホモログ領域とが融合した融合タンパク質であることが見いだされた。そこで、IMPase領域がNADP(H)aseであるという仮説をたて、MJ0917の機能解析を行った結果、IMPaseホモログ領域が、IMPase活性を示さないものの、強いNADP(H)aseおよびフルクトース-1,6-ビスフォスファターゼ(FBPase)活性を示すことが明らかになった。MJ0917は、NADP⁺の合成と分解という相反する活性をもつタンパク質[NADKとNADP(H)ase]からなる融合タンパク質であるが、NAD⁺/NADP⁺比を高く保ちうる種々の生化学的特徴を備えていることを示した。さらに、ある種のアーキアのゲノム上では、NADK遺伝子とIMPaseホモログ遺伝子が一部重複したオペロン様の構造をとっており、IMPaseホモログとNADP(H)代謝との関連性を示唆した。また、他のアーキアIMPaseホモログである*M. jannaschii*由来MJ0109と*Archaeoglobus fulgidus*由来AF2372も、IMPaseとFBPase両活性のほかにNADP(H)ase活性を示すことを実証した。以上の知見は、真正細菌と真核生物のIMPaseホモログがNADaseであるという重要な可能性も示唆した。

3. NADKの構造機能相関、Pn利用機構

結核菌Pn/ATP-NADK(Ppnk)のアポ型とホロ型(NAD⁺との複合体)のX線結晶構造(立体構造)を決定し(図2)、NAD⁺結合部位の微細構造とリン酸受容体認識にかかわる構造的要因を解析した。NAD⁺結合部位の形成にかかわるアミノ酸残基は、すべてのNADKに高度に保存されており、一次構造のアラインメントから明らかにした保存領域AおよびBに対応していた。また、ホロ型の解析により、アラインメントのみからでは特定できない保存領域NE/D short motifを見いだした。これらの保存残基の中で、特に、Asp189は隣接サブユニット由来であり(図3)、Ppnkの二量体(A-A'またはB-B'; 図2)内のサブユニット間相互作用に関与した。一方、Gly187は、NADKとNAD(H)Kにおいて特徴的に保存されており[NADK, Arg; NAD(H)K, Glyまたは極性アミノ酸]、隣接サブユニットのNAD⁺(特にニコチンアミド環)結合部位の近傍に位置し得た(図3)。NAD⁺とNADHがニコチンアミド環にお

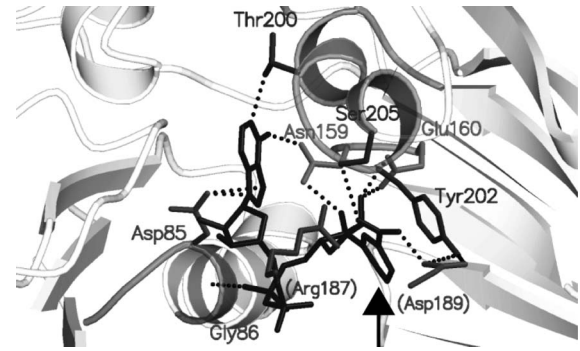


図3 PpnkのNAD⁺結合部位
矢印; ニコチンアミド環. Asp189, Gly187(画面上で
Arg187に置換)は隣接サブユニットに由来。

いてのみ異なるため、該当部位のアミノ酸残基がNADKとNAD(H)Kのリン酸受容体特異性を決定する構造的要因である可能性が示唆された。実際、部位特異的変異により、NADKにおいては、該当部位の荷電性或いは疎水性アミノ酸がNAD⁺への特異性を規定することを証明した。また、本研究の過程で、該当部位のGlyまたは極性アミノ酸への1アミノ酸置換によるNADKからNAD(H)Kへの分子変換に成功した。以上の知見から、NADKにおけるNAD⁺結合部位の形成とリン酸受容体特異性に対する、二量体内サブユニット間相互作用の重要性を明確にし、NADKがホモ多量体構造をとる根拠、すなわち単量体のNADKが存在しない根拠を示した。

一方、Pn利用機構解明の観点から、Pn/ATP-NADKと同様にPn利用酵素であるグラム陽性細菌由来Pn/ATP-グルコキナーゼのホロ型(グルコースとリン酸との複合体)の立体構造を決定し、Pn結合部位の構造とPn利用機構(非連続型利用機構)を明らかにした。なお、細菌由来グルコキナーゼと真核生物由来ヘキソキナーゼは同じ反応(グルコースのリン酸化)を触媒するが、両者の一次構造の低い相同性のため、両キナーゼの構造と進化の相関性の有無は論争的であった。細菌由来Pn/ATP-グルコキナーゼの立体構造を初めて明らかにし、両キナーゼの構造上の相関性を初めて実証し、両キナーゼの構造と進化にかかわる長年の論争に決着をつけた。

本研究は、京都大学(旧)食糧科学研究所食糧安全利用分野および京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野において行われたものである。終始ご指導、ご鞭撻をいただいた京都大学大学院教授 村田幸作先生に感謝いたします。また、本研究に関してご指導くださいました京都大学大学院助教授 橋本 渉先生、タンパク質構造解析においてご指導賜りました京都大学大学院応用生命科学専攻教授 三上文三先生にお礼申し上げます。本研究にご協力いただきましたポスドク研究員、研究生、学生諸君、企業の共同研究者の皆様に感謝します。永年にわたり激励をいただきました恩師京都大学名誉教授(現 石川県立大学教授)熊谷英彦先生、京都大学大学院教授 山本憲二先生に感謝します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長の清水昌先生(京都大学大学院教授)ならびに授賞選考委員の諸先生方に深くお礼申し上げます。