



東京大学生物生産工学研究センター 吉田 彩子

アミノ酸代謝酵素を中心とした機能と調節に関する研究

はじめに

生物は細胞内の代謝の恒常性を維持するため、様々な代謝制御機構を有している。タンパク質構成成分であるとともに、生体調節因子としての機能も持つアミノ酸は、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制御機構を理解することにより、より効率的な生産につながると考えられる。筆者はアミノ酸を中心に代謝酵素の調節機構に関して、様々な側面から明らかにすることを目指しており、本研究では、アミノ酸発酵菌 *Corynebacterium glutamicum* や高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成酵素やロイシン生合成酵素に着目し、その調節機構や機能および進化について研究を行った。

1. *Corynebacterium glutamicum* 由来 アスパラギン酸キナーゼ (AK) の活性制御機構の解析

工業的なアミノ酸生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* は、家畜飼料添加物としての需要が高い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る。この性質はリジンの大量生産には不利であることから、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) への耐性を指標に AK のフィードバック阻害耐性変異株が単離され、さらに育種された菌がリジン高生産株として工業生産に利用されてきた。しかしながら、CgAK のフィードバック阻害機構や AEC 耐性機構は長年の謎であった。CgAK は、触媒ドメインと阻害剤が結合する活性制御ドメインから構成される 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 $\alpha_2\beta_2$ 構造をとるという特徴的な四次構造を持つ。さらに、CgAK は AK を初発酵素としてアスパラギン酸から生合成さ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される、協奏阻害を受ける。このように産業的にも学術的にも興味深い研究対象である CgAK の活性制御機構を解析するため、筆者らは X 線結晶構造解析や生化学的解析を行った。

その結果、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および、リジン・スレオニンが結合した阻害型 (図1)

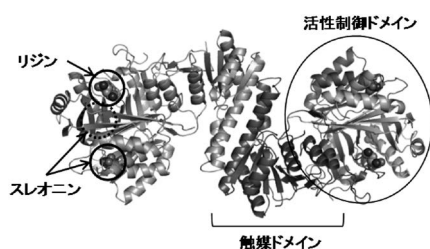


図1. CgAK の阻害型結晶構造

とスレオニンのみが結合した活性型の $\alpha\beta$ 全長構造を決定することに成功した。これらの構造比較や変異体解析から、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微細な構造変化による基質結合の阻害という二段階から起きることを明らかにした。さらに、フィードバック阻害耐性 (AEC 耐性) 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 耐性を与えるアミノ酸置換が不活性型構造を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原子レベルで示した。これに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に成功した^{1), 2)}。

2. アミノ基キャリアタンパク質を用いる新規リジン生合成マシナリーの構造機能解析

一般にリジン生合成には、前述の AK を初発酵素としてジアミノピメリン酸 (DAP) を経由する DAP 経路と、カビや酵母でみられる α -アミノアジピン酸 (AAA) を経由する AAA 経路が存在する。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 を経由し、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。LysW は AAA 以降の反応中間体のアミノ基の保護基として働くだけでなく、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。筆者らはこのアミノ基キャリアタンパク質 LysW の機能を明らかにするため、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を決定することに成功した (図2)。その相互作用様式から、強く負に帯電した LysW は、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³⁾。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、リジン生合成酵素群とはアミノ酸配列や構造などが全く異なる脂肪酸生合成酵素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

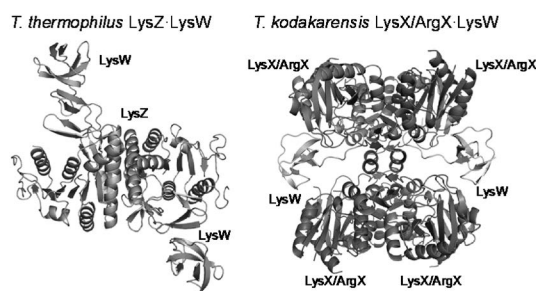


図2. アミノ基キャリアタンパク質とリジン (アルギニン) 生合成酵素の複合体の結晶構造

的な認識機構であることが推測された。

LysW を用いるリジン生合成経路は、各生合成酵素の類似性からアルギニン（オルニチン）生合成経路と同一の進化的起源をもつと考えられる。筆者らは、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 を利用してリジンを生合成すること、さらにリジン生合成酵素群がすべて二機能性を有し、オルニチン生合成をも担っていることを見出した⁴⁾。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。リジンとオルニチンが一组の酵素群で生合成されうるのは、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となった。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することで、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た（図2）。さらに、その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。

3. *Thermus thermophilus* におけるアセチル化修飾による代謝調節機構の解析

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としてよく研究されてきたが、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見いだされている。アセチル化タンパク質に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 などが、脱アセチル化の基質として NAD⁺ といった鍵代謝産物が用いられることから、タンパク質アセチル化修飾と代謝調節との関連が示唆されている。筆者らは、高度好熱菌 *T. thermophilus* 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、ロイシン生合成初発酵素 2-isopropylmalate synthase (IPMS) に着目した。同菌には2つの IPMS ホモログが存在したため、まず1つが IPMS であり、他方がイソロイシン生合成に関わる citramalate synthase であることを明らかにした⁵⁾。アセチル化タンパク質として同定した IPMS のアセチル化機構を解析したところ、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、触媒ドメインと活性制御ドメインの間に存在し、基質結合やロイシンによるフィードバック阻害に重要だとされるリンカードメイン中の特定のリジン残基がアセチル化されることで活性が負に制御されることを見出した。さらにアセチル基を取り外す脱アセチル化酵素を同定することにも成功した。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う複雑な制御機構の存在を明らかにした（論文投稿中）。

さらに、筆者らは *T. thermophilus* 内でタンパク質アセチル化酵素依存的にアセチル化されるタンパク質として、短鎖脂肪酸から短鎖アシル CoA への変換を担う CoA transferase を同定した。興味深いことに、CoAT は NAD⁺ を結合するタンパク質

と相互作用することで、NAD⁺ 依存的に活性阻害を受けることを見出した。これは CoAT がアセチル CoA や NAD⁺ といった細胞内の代謝機能を感じて、翻訳後修飾やタンパク質間相互作用によって複雑に制御されていること、つまり CoAT の活性調節が細胞生理に重要な働きを持つことを示唆している。CoAT の生理的意義を明らかにすることで、CoA 体や短鎖脂肪酸代謝調節機構の理解につながると考えている。

おわりに

本研究ではバクテリアのアミノ酸を中心とした代謝酵素の機能や調節に関して、構造生物学的手法や遺伝生化学的手法等を用いて研究を行ってきた。バクテリアにみられる2種類のリジン生合成経路において、初発酵素 AK の制御機構や、新規キャリアタンパク質を用いる生合成機構やその進化について明らかにした。またタンパク質アセチル化という比較的新しい酵素調節の概念に着目し、ロイシン生合成の鍵酵素 IPMS の制御機構を見出した。今後もバクテリアの持つ多様で特徴的な代謝経路やその制御機構を探索していきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Yoshida A, Tomita T, Kurihara T, Fushinobu S, Kuzuyama T, Nishiyama M. Structural insight into concerted inhibition of $\alpha\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. J. Mol. Biol. Vol. 368, p 521–536, (2007)
- 2) Yoshida A, Tomita T, Kuzuyama T, Nishiyama M. Mechanism of concerted inhibition of $\alpha\beta_2$ -type hetero-oligomeric aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. J. Biol. Chem. Vol. 285, p 27477–27486, (2010)
- 3) Yoshida A, Tomita T, Fujimura T, Nishiyama C, Kuzuyama T, Nishiyama M. Structural insight into amino group-carrier protein-mediated lysine biosynthesis: crystal structure of the LysZ-LysW complex from *Thermus thermophilus*. J. Biol. Chem. Vol. 290, p 433–447, (2015)
- 4) Yoshida A, Tomita T, Atomi H, Kuzuyama T, Nishiyama M. Lysine biosynthesis of *Thermococcus kodakarensis* with the capacity to function as an ornithine biosynthetic system. J. Biol. Chem. Vol. 291, p 21630–21643, (2016)
- 5) Yoshida A, Kosono S, Nishiyama M. Characterization of two 2-isopropylmalate synthase homologs from *Thermus thermophilus* HB27. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 501, p 465–470, (2018)

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、および同微生物機能代謝工学研究室にて実施したものです。リジン生合成酵素の機能と調節に関する構造生物学的な研究を行う機会を与えてくださり、学生時代より今まで多大なご指導を頂くとともに、本賞にご推薦くださいました、西山真先生に心より感謝申し上げます。高度好熱菌のタンパク質アシル化修飾に関する研究に取り組む機会を与えてくださり、ご指導頂きました古園さおり先生に厚く御礼申し上げます。細胞機能工学研究室において、日頃よりご助言、ご指導いただきました葛山智久先生に心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、多くの先生方のご協力を賜りました。この場を借りて感謝申し上げます。また本研究に貢献していただいた研究員、学生の方々ははじめ、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深く感謝申し上げます。