



高度に保存されたビタミン B<sub>6</sub> 結合タンパク質の機能解析と応用展開

名古屋大学大学院生命農学研究科 講師 伊藤 智和

はじめに

ビタミン B<sub>6</sub> はピリドキシン (PN), ピリドキサル (PL), ピリドキサミン (PM) と、これらリン酸体の総称である。このうちピリドキサルリン酸 (PLP) は、多くのアミノ酸代謝酵素の補酵素として多岐に亘る生体反応に関与する (図1)。筆者は、多くの生物に保存される PLP 結合酵素・タンパク質をターゲットとし、その機能解析や応用研究など、酵素学を基盤とした研究を行ってきた。以下、特に精力的に研究してきた二項目について紹介する。

1. D-アミノ酸代謝に関わる二種類の PLP 依存性酵素の機能解析と応用展開

D-アミノ酸は、古くから細菌のペプチドグリカンや (D-Ala, D-Glu), ある種の抗生物質中に見いだされてきた (D-Val など)。近年、ヒトを含めた真核生物中で様々な遊離 D-アミノ酸が見いだされ、重要な生理作用を示すことが明らかとなりつつある。特に哺乳類では、D-Ser, D-Asp が内因性メッセンジャーとして、神経伝達や内分泌系で重要な役割を有することが明らかとなりつつあり、その動態や機能の詳細に注目が集まっている。

1-1. D-セリンデヒドラーゼ

D-Ser は哺乳類脳内で、記憶や学習などに関与する N-メチル D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターの内因性コアゴニストとして機能し、筋委縮性側索硬化症 (ALS), 統合失調症, 腎障害など種々の疾患との関連性が指摘されるようになってきた。筆者らは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の機能未知タンパク質 Ygl196Wp が、PLP と Zn<sup>2+</sup> 依存性の「D-セリンデヒドラーゼ」(D-Ser をピルビン酸とアンモニアに分解する。以下 Dsd1p) であることを同定した。Dsd1p は真核生物で見出された初めての D-セリンデヒドラーゼであり、同一の化学反応を触媒する既報の酵素とは進化的・構造的に全く異なっていた。本酵素の Zn<sup>2+</sup> の意義や反応機構、細胞性粘菌における cAMP

シグナリングにおける重要性など、*in vivo, in vitro* におけるユニークな諸性質を明らかとした。また、Dsd1p の反応特性を利用し、ブナシメジに存在するユニークな D-アミノ酸 (D-2-アミノ-3,4 ジヒドロキシ酪酸) の同定や、D-Ser 酵素減少剤を開発した。また、Dsd1p と改変型アラニンラセマーゼ (mAR) を用いた初めての「D-, L-セリン酵素定量法」を開発した (図2)。D-Ser を Dsd1p によって特異的にピルビン酸へと変換し、続く乳酸脱水素酵素もしくはピルビン酸オキシダーゼによる異化過程によって生ずる NADH や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量から D-Ser レベルが定量できる。L-Ser 定量の際には、ここに Ser への反応性を上昇させた mAR を追加する。本法は、機器分析を用い 1 サンプルあたり 1 時間程度を要していたセリン定量の簡便化・ハイスループット化が可能である。これを用いたヒト尿中の D-, L-Ser の動態解析では、尿中 D-Ser レベルがアテローム性動脈硬化症の患者における腎機能悪化の予測バイオマーカーとして利用できる可能性が見出された。

1-2. セリンラセマーゼ

セリンラセマーゼ (SR) は哺乳類における主要な D-Ser 合成酵素であり、多くの真核生物に保存されている。SR はセリンのラセミ化 (L-Ser ⇌ D-Ser) に加え、これと同等かそれ以上のデヒドラーゼ活性 (D-, L-Ser ⇒ Pyruvate + NH<sub>3</sub>) を示す。筆者らは細胞性粘菌やマウス由来の SR を用い、ラセミ化反応が PLP を挟んで相対する Lys および Ser 残基による二塩基機構で進行することや、デヒドラーゼ反応の反応特異性が基質の C<sub>β</sub> 位ヒドロキシル基の配向によって決定されることなど、SR の反応・基質特異性をもたらすメカニズムを明らかとした。また、富山大学・森寿教授らと共同で、哺乳類の D-Asp 生合成酵素を探索してきた。その過程で、SR が弱いながらも Asp のラセミ化活性 (L-Asp ⇌ D-Asp) を有することを見出した。SR ノックアウトマウスの解析や、SR 欠損・過剰発現細胞の解析などを経て、SR が哺乳類 D-Asp 生合成にも関与する可能性を見出した。

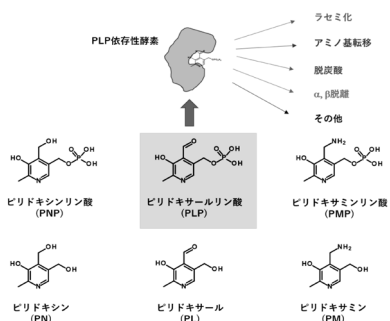


図1. ビタミン B<sub>6</sub>

6種類の相互変換可能な B<sub>6</sub> ビタマーのうち、PLP は、多くのアミノ酸代謝酵素の補酵素としてはたらく。

D-セリン量比を測る～簡便・迅速な酵素定量法～

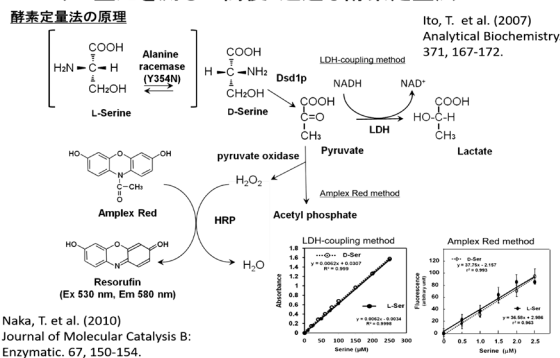


図2. D-, L-セリン酵素定量法

## 2. ビタミン B<sub>6</sub> の恒常性維持, これによる生体制御に関与するタンパク質に関する研究

### 2-1. YggS/PROSC タンパク質

YggS/PROSC タンパク質は, バクテリアからヒトに至る大部分の生物に高度に保存される PLP 結合タンパク質である。筆者は, この構造が細菌の D-Ala 合成酵素・アラニンラセマーゼのドメインと酷似していることに興味を持ち研究を開始した。E. coli 由来の当該タンパク質 (YggS) 欠損株の詳細な代謝物解析などから, YggS が Ile/Val 代謝, 補酵素 A レベルの維持など, アミノ酸・ケト酸をはじめとする多様な代謝系の恒常性維持に重要な役割を果たすことや, この機能がバクテリアからヒトにまで保存されていることを初めて見出した。ごく最近, YggS のヒトオソログ (PROSC) の欠損・変異が, ビタミン B<sub>6</sub> 依存性てんかんの原因として特定された。関連し, E. coli yggS 欠損株が, 野生株にはほとんど存在しないピリドキシンリン酸 (PNP) を高蓄積することが報告された。本タンパク質がアミノ酸・ケト酸に加え, ビタミン B<sub>6</sub> 恒代謝にも関与することが示唆された。我々は, 大腸菌, 酵母, サルモネラ菌などのモデル生物を用い, 当該タンパク質の欠損が細胞内 B<sub>6</sub> プールに与える影響を解析した。その結果, YggS/PROSC タンパク質が多くの生物における B<sub>6</sub> ビタミンのホメオスタシスの鍵因子であること, 特に, 本タンパク質が生体内 PNP の低レベル維持に必須の役割を果たすことが明らかとなった。大腸菌をモデルとして用い, 当該タンパク質の欠損によって異常蓄積する PNP が, PLP 依存性酵素であるグリシン開裂系の機能不全を引き起こすことや, Ile/Val 代謝系を含めた多様な代謝系を攪乱する要因であることなど明らかとし, 筆者らや他の研究者らが見出した yggS 欠損株のフェノタイプの多くが PNP の蓄積に起因することを明らかとした。本タンパク質の分子機能は未だ明らかではないが, これが PLP ⇌ PMP サイクリングに関与するとの仮説のもと研究を継続している。

YggS/PROSC に関する研究は, 新たな研究展開にもつながった。E. coli のビタミン B<sub>6</sub> 動態を子細に解析する過程で, E. coli が PL を極めて効率的に PN へ変換することや, PN の排出能を有することを見出し, PL → PN の変換を触媒する PL レダクターゼ (PLR) の同定に至った。PLR は, 酵母と植物のみで同定されていた。E. coli PLR は, 酵母や植物由来 PLR との一次構造上の相動性をほとんど示さないが, 同一のスーパーファミリー (Aldo-Keto Reductase superfamily) に属していた。現在 PLR は, 大腸菌, 酵母, 植物などにおける例外的な B<sub>6</sub> 代謝酵素と考えられている。筆者らは PLR が, より広範な生物において, ビタミン B<sub>6</sub> の体内動態に関与すると予想し解析を進めている。

また, E. coli yggS 欠損株の菌体内アミノ酸分析の過程で, 同株がグルタチオンアナログである  $\gamma$ -glutamyl-aminobutyryl-glycine (オファルミン酸) を高濃度蓄積することを見出した。オファルミン酸はグルタチオンのシステイン部が 2-アミノ酪酸 (2-AB) に置換された構造を有する。哺乳類では, 水晶体レンズや, 急性肝障害時の血中に見いだされる内因性化合物であり, その血中濃度が肝障害・酸化ストレスのバイオマーカーとして利用できることや, グリオキサラーゼの阻害剤として利用

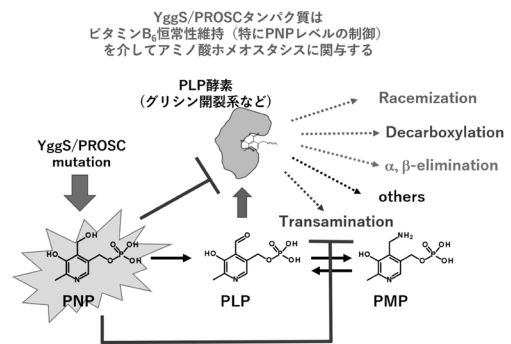


図3. YggS/PROSC タンパク質欠損が及ぼす影響

できる可能性が示唆されていた。また, カルシウム感知受容体 (CaSR) のリガンドとして, 強いコク味を示すことが報告され, リサーチツールのみならず, 食品添加物としての可能性も示されていた。E. coli yggS 欠損株をプラットフォームとして, 合成経路の増強, 合成酵素のフィードバック阻害の脱感作, 分解系の欠損, インポーターの欠損などの代謝工学的アプローチを経てオファルミン酸の新規な発酵生産法の開発に成功した。

### 2-2. PLP 依存性転写因子 MocR/GabR タンパク質

MocR/GabR タンパク質は大部分の細菌に存在する PLP 結合性の転写制御因子である。多くの細菌はこのタイプの転写因子を複数コードするが, その生理機能が明らかとなったものは少なく, 転写制御の分子メカニズムもほとんどわかっていなかった。筆者らは, 枯草菌の  $\gamma$  アミノ酪酸 (GABA) 代謝酵素の発現制御に関与する「GabR」の PLP・リガンド (GABA, DNA) 存在下における熱力学的, 分光学的解析, X線構造解析などから, PLP-GABA 外部アルジミン形成が GabR の構造変化や GabR-DNA 結合状態のリアレンジメントを誘導し, GABA 代謝酵素の発現誘導をもたらすことを明らかとした。

また, Brevibacillus brevis の機能未知 MocR/GabR タンパク質であった BBR47\_28440 タンパク質 (DdlR) の機能解析に取り組んだ。DdlR が同一オペロン内に存在する D-Ala-D-Ala リガーゼの発現制御に関わること, PLP-D-Ala-D-Ala 外部アルジミン形成がその転写制御に関わること, 同様の転写制御が放線菌やバチラス属細菌で保存される可能性が見出された。

**謝 辞** 本研究の大部分は, 名古屋大学大学院生命農学研究科 応用酵素学研究室 (旧・生体高分子学) で行われたものです。本研究の遂行にあたり, 学生時代から多大なご指導ご鞭撻を頂きました名古屋大学大学院生命農学研究科教授, 吉村徹先生に心から感謝申し上げます。また, 多くのご助言を頂きました名古屋大学大学院・生命農学研究科准教授, 邊見久先生に御礼申し上げます。本研究の遂行には, 多くの共同研究者の皆様にご支援を頂きました。また, 応用酵素学 (旧・生体高分子学) 研究室の学生諸子には多大なご協力を頂きました。皆様にご心より感謝申し上げます。最後に, 本奨励賞にご推薦くださいました, 日本農芸化学会中部支部長・人見清隆先生 (名古屋大学大学院創薬科学研究科教授) ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に感謝申し上げます。