

未知の中心的代謝酵素の探索と性状解析—生命の多様性および進化の理解を目指して



理化学研究所 生体機能触媒研究チーム 千葉 洋子

はじめに

私は生物の代謝経路および酵素がどのような過程を経て生まれ多様化していったのかという視点から、生命の進化を理解することを目指している。しかし、これまでのところ我々人類は現存する生物の代謝・酵素、しかも中心的代謝のそれについてすら十分に理解しているとは言い難い。過去の代謝を予測する上で、現存する代謝・酵素について正確な情報を得ておくことは必須である。そのため、これまで私は現存生物の有する未知の中心的代謝を明らかにすることを目的とし、新規酵素の同定および性状解析を行ってきた。

1. アミノ酸生合成経路の多様性—新規セリン合成酵素の同定と性状解析

多くの生物において、セリンは解糖系もしくは糖新生系の間代謝産物である 3-P-glycerate から3つの酵素反応を経て作られることが知られている(図1)。しかし、ゲノム情報を精査したところ、3ステップの内最初の2反応を担う酵素遺伝子を有しているものの、最後の反応を担う酵素 phosphoserine phosphatase (PSP) 遺伝子を欠く生物が多数存在することが明らかになった¹⁾。そこでそれら生物から3種を選定し、それぞれ PSP の有無を確認した。以下に示す研究により、セリン合成酵素 PSP には遺伝的な多様性が存在し、生物は進化の過程で少なくとも3回 PSP を「発明」したことが明らかになった。また、新たに2種類の PSP を同定したことで、図1に示すセリン生合成経路の存在の有無をゲノム情報から高精度で予測することが可能となった。

1.1 Type 2 PSP の発見: *Hydrogenobacter thermophilus*

好熱性独立栄養性細菌 *H. thermophilus* の細胞破砕液から PSP 活性が検出されたので、本反応を担う酵素を精製・同定した。既知の PSP は全て明確な相同性を有するタンパク質 (type 1 PSP) であるのに対し、*H. thermophilus* の PSP は既報のそれと進化系統的に全く異なる superfamily に属した (type 2 PSP)¹⁾。さらに X 線結晶構造解析および変異体解析を行い、様々な生物が有する type 2 PSP と類似のタンパク質が PSP として機能しうるかを *in silico* で高精度に予測することを可能にした²⁾。加えて、本酵素の酵素的および代謝的な特徴も報告し

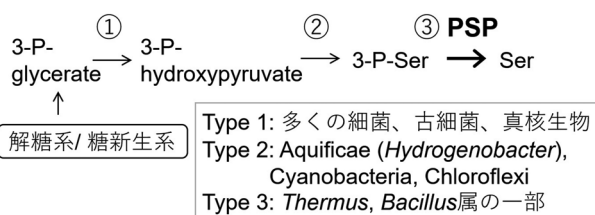


図1. 3ステップのセリン生合成経路および PSP の生物間分布

た^{3,4)}。

1.2 Type 3 PSP の発見: *Thermus thermophilus*

好熱性従属栄養性細菌 *T. thermophilus* についても同様にタンパク質を精製・同定した。本菌の PSP は type 1 PSP と同じ superfamily に属するものの、アミノ酸配列間の相同性が極めて低く、既報の PSP とは独立して PSP 触媒活性を獲得したことが強く示唆された⁵⁾。

1.3 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は PSP を欠く一方、ヒトの寄生虫であるの赤痢アメーバ (*E. histolytica*) はセリン生合成経路の第1, 第2酵素を有するものの第3酵素の PSP を欠くことが明らかになった。本生物に近縁で爬虫類の寄生虫である *Entamoeba invadens* には type 1 PSP が存在することから、同属の寄生虫内において PSP の有無およびセリン生合成能力に多様性があることが示された⁶⁾。

2. エネルギー代謝の理解—無機二リン酸 (ピロリン酸; P_i) 利用酵素の起源解明を目指した性状解析

P_i は2分子のリン酸が高エネルギーリン酸結合で結ばれた分子である。本分子はエネルギー通貨としての ATP の最小単位を有するため、原始のエネルギー通貨であった可能性があると言われてきた。一方、現存生物において P_i は DNA やタンパク質合成など多くの反応で副産物として生じていて、本 P_i のエネルギーの多くは熱として失われている。しかし現存生物ほどふんだんに ATP を産生できなかったと思われる原始的な生命においては、本 P_i のエネルギーが現在よりも有効活用されていた可能性が考えられる。実際、現存する酵素の一部は、リン酸およびエネルギー供与体として ATP の代わりに P_i を使用している。これら P_i 利用酵素は ATP 利用酵素の元となったのではないかと過去には期待されたが、系統解析により現存の P_i 利用酵素は同機能を有する ATP 型酵素から派生したというのが現在の定説となっている (図2A)。

2.1 P_i 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase (P_i-PEPCK) の遺伝子同定

PEPCK は基質によって、P_i 型、ATP 型、GTP 型の3種類に分類される。詳細な解析が進められていた ATP および GTP-PEPCK に対し、P_i-PEPCK については 1960-70 年代に活性が報告された後遺伝子が同定されておらず、3者間の進化的関係を論じることが不可能であった。そこで我々は前出の *E. histolytica* から P_i-PEPCK を精製し、その遺伝子を同定した。既存の一般的な配列およびモチーフ解析により P_i-PEPCK が ATP-, GTP-PEPCK を含む既知タンパク質と全く類似性を示さなかったことから、これらは独立に誕生したことが示唆された。また、本酵素が様々な細菌および限られた、しかし系統的に多様な単細胞真核生物に存在することを示した⁷⁾。

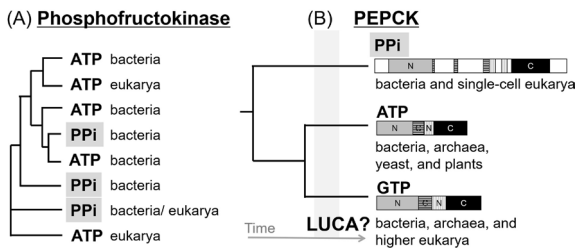


図2. 同じ機能を有する ATP型酵素と Ppi型酵素の進化的関係の比較

(A) 研究が進んでいた phosphofructokinase の例. ATP型が元となり、そこから Ppi型が複数回出現したことが示唆される。(B) PEPCK の進化的関係. 3者の共通祖先からまず Ppi型の先祖が分かれ、その後 ATP型と GTP型が分岐したことが示唆される。

2.2 X線結晶構造解析で明らかになった意外なこと

Ppi-PEPCK の X線結晶構造解析を行ったところ、驚くことに約1100 アミノ酸残基からなる Ppi-PEPCK は約600残基からなる ATP-, GTP-PEPCK の構造と一致する core domain と複数の付加構造によって形成されていることが明らかとなった⁸⁾。また3種類の PEPCK において、core domain を形成する2次構造の順番は1次構造上で完全に保存されていた。さらに、活性に直接関与する残基も保存されていた。これらの結果は、3種類の PEPCK が共通祖先を有することを強く示唆する。3種類の PEPCK の系統関係、生物間分布、Ppi-PEPCK のみに付加構造が存在することを総合すると、以下の進化的ストーリーが考えられる。すなわち、まず Ppi-PEPCK の祖先が共通祖先から分岐し、その後 ATP型と GTP型が分岐した。この ATP型と GTP型の分岐は現存生物の共通祖先 (LUCA) の誕生以前と考えられることから、Ppi-PEPCK の誕生も LUCA より古いと推察される (図2B)。本結果は、Ppi利用酵素が LUCA 以前に存在したことを初めて実験的に示唆したものである。

おわりに

微生物を大量に培養し、そこから活性を指標にタンパク質を精製するのは体力的・精神的にけっこう大変だ。しかし自分が同定したタンパク質が公共のデータベースで hypothetical protein (あるいは間違った酵素名) から正しい名前に変更され、KEGG map 上で菌抜けになっていた代謝経路がつながると、ほんの小さなこととはいえ世界中で知が共有されたことが実感できてうれしい。生命の誕生と進化を理解すべく今後様々な研究手法を取り入れていきたいが、同時に新規タンパク質の同定もこれまで通り続けようと思う。

(引用文献)

- 1) Chiba, Y., Oshima, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. Discovery and analysis of cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homologs as novel phosphoserine phosphatases in *Hydrogenobacter thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 11934–11941 (2012)
- 2) Chiba, Y., Horita, S., Ohtsuka, J., Arai, H., Nagata, K., Igarashi, Y., Tanokura, M., and Ishii, M. Structural units important for activity of a novel-type phosphoserine phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 revealed by crystal structure analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 11448–11458 (2013)
- 3) Kim, K.T., Chiba, Y., Arai, H., and Ishii, M. Discovery of an intermolecular disulfide bond required for the thermostability

of a heterodimeric protein from the thermophile *Hydrogenobacter thermophilus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80, 232–240 (2015)

- 4) Kim, K.T., Chiba, Y., Kobayashi, A., Arai, H., and Ishii, M. Phosphoserine phosphatase is required for serine and one-carbon unit synthesis in *Hydrogenobacter thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 199, e00409–e00417 (2017)
- 5) Chiba, Y., Yoshida, A., Shimamura, S., Kameya, M., Tomita, T., Nishiyama, M., Takai, K. Discovery and analysis of a novel type of the serine biosynthetic enzyme phosphoserine phosphatase in *Thermus thermophilus*. *The FEBS Journal* 286, 726–736 (2019)
- 6) Chiba, Y., Makiuchi, T., Jeelani, G., Nozaki, T. Heterogeneity of the serine synthetic pathway in *Entamoeba* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 207, 56–60 (2016)
- 7) Chiba, Y., Kamikawa, R., Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., and Nozaki, T. Discovery of Ppi-type phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in eukaryotes and bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 290, 23960–23970 (2015)
- 8) Chiba, Y., Miyakawa, T., Shimane, Y., Takai, K., Tanokura, M., Nozaki, T. Structural comparisons of phosphoenolpyruvate carboxykinases reveal the evolutionary trajectories of these phosphodiester energy-conversion enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 294, 19269–19278 (2019)

謝 辞 本研究は博士後期課程時代に東京大学大学院農学生命科学研究科応用微生物学研究室で着手し、国立感染症研究所および海洋研究開発機構で展開したものです。「せっかくやるならど真ん中を」と言って中心的代謝経路に目を向けるようご助言くださいました東京大学の五十嵐康夫先生、ゴードン会議参加を通じて世界の広さを教えてくださり、また本賞に推薦してくださいました石井正治先生、冷静なアドバイスをくださいました新井博之先生、とことん議論に付き合ってくださいました亀谷将史先生に心から感謝申し上げます。また、共に PSP の性状解析を行ってくれた Keug Tae Kim 博士にも感謝いたします。国立感染症研究所の野崎智義部長 (現・東京大学医学部) および筑波大学の橋本哲男先生には嫌気性真核生物ならではの代謝の複雑さ、面白さを教えていただきました。海洋研究開発機構では高井研分野長に学際的な視点で生命をとらえるエネルギー的な姿を間近で見せていただき、また、布浦拓郎博士および山本正浩博士には研究の進め方について多大なるアドバイスをいただきました。また、所属した各研究室で多くの方からサポートしていただくとともに、効率よく研究を進めるノウハウ等も学ばせていただきました。限られた紙面で全ての方のお名前を挙げることは叶いませんが、この場を借りて御礼申し上げます。

本研究は共同研究なくしてはなしえませんでした。タンパク質の立体構造解析については、東京大学大学院農学生命科学研究科の田之倉優先生、永田宏次先生、宮川拓也先生、堀田彰一郎 (現・福島県立医科大学) 博士のお力をお借りしました。*T. thermophilus* の生理学的試験は東京大学生物生産工学研究センターの西山真先生、富田武郎先生、吉田彩子博士のご協力を得ました。分子系統解析については法政大学大島研郎先生、京都大学神川龍馬先生、順天堂大学牧内貴志先生にご指導いただきました。深謝いたします。

最後に本研究をさらに発展させる場を与えてくださっている現所属、理化学研究所の中村龍平チームリーダーおよび研究室員に感謝し、謝辞を結びます。