

## アミノ酸代謝に関わる酵素に関する構造生物学的研究



東京大学生物生産工学研究センター 助教 富田 武 郎

はじめに

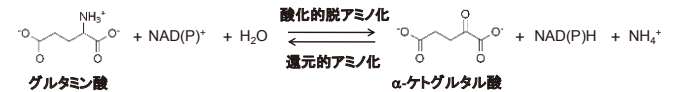
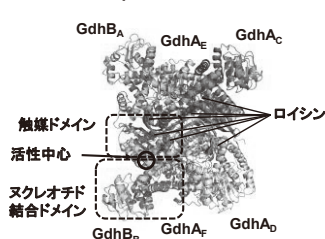
アミノ酸はタンパク質の構成成分であると同時に、近年生体調節因子としての機能も注目されている。実際、これまでグルタミン酸は食品中のうまみ成分として、リジンは家畜飼料として大量に生産され、用いられており、最近ではその他のアミノ酸も食品のサプリメントとして利用され、ますますその需要が高まっている。アミノ酸の生理機能や発酵生産の基盤を明らかにすることによって、さらなる有効利用へと展開されるものと考えられる。筆者は、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のグルタミン酸脱水素酵素の解析を通じて、哺乳類由来酵素と共通するロイシンによる機能調節機構を明らかにした。また、新規リジン生合成に関わる酵素の構造生物学的研究を行い、ユニークな調節機構、寛容な基質認識機構およびキャリアタンパク質を用いる生合成機構の一端を明らかにした。

## 1. グルタミン酸脱水素酵素の機能調節に関する研究

グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) は、NAD(P)(H) を補酵素とし、 $\alpha$ -ケトグルタル酸とグルタミン酸との間の変換を触媒する酵素である (図1)。哺乳類由来のGDHは様々な代謝化合物による複雑な調節機構が存在しており、GTPやATP、NADHなどによる阻害を受け、ADPやNAD<sup>+</sup>、ロイシンなどによる活性化を受けることが知られている。多くの化合物によるアロステリック調節はアンテナヘリックスを介して起こることが示されている。ヒトGDH1においてGTPによる阻害の耐性を引き起こす変異は、毒性の高いアンモニアの過剰放出を促すと同時に、インスリン過剰分泌を促すことから、高インスリン/高アンモニア (HI/HA) 血症の原因として特定されている。一方、アンテナヘリックスを持たない植物や微生物由来のGDHはアロステリック調節を受けないと考えられてきた。一般にGDHは同一サブユニットからなるホモ6量体であるが、筆者は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のGDHが互いに相同性を有するタンパク質であるGdhAとGdhBからなるヘテロ複合体を形成するこれまでに全く知られていないユニークな特徴を持つことに加え、哺乳類以外の生物由来のGDHとしては初めてロイシンによって強く活性化を受けることを発見した。さらに、ロイシンによる活性化機構を明らかにするために *T. thermophilus* 由来のGDHの結晶構造解析を行い、ロイシン結合型構造を決定することに成功した (図1)。結晶構造からロイシンはGDHの活性中心から離れたサブユニット間境界領域に結合していることが明らかになり、それを取り巻くアミノ酸残基により特異的に認識されていることが示された (図2)。驚くべき事に、ロイシンを認識するアミノ酸残基は他の多くの生物では保存されていないものの、ヒトやウシなど哺乳類のGDHでは保存されており (図2)、ロイシンにより特に強い活性化を受けるヒトGDH2の変異体解析によって哺乳類由来のGDHも同様な機構でロイシンによって活性化されることを直接的に示すことに成功した。以上の結

果から、微生物においてアミノ酸をシグナルとした新規な代謝調節機構が存在することが示されただけでなく、栄養シグナルとして機能するロイシンのセンシング機構の一端が明らかになった。さらには哺乳類のGDHの活性化機構についても重要な情報を与えており、GDHをターゲットとした創薬開発にもつながるものと期待される。

## グルタミン酸脱水素酵素の反応

*Thermus thermophilus* 由来GDH

## ウシ由来GDH

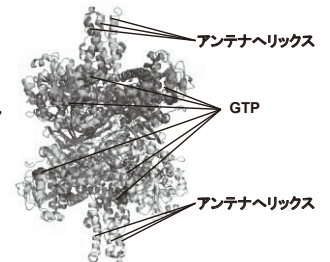


図1 グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の反応 (上段) と結晶構造 (下段)

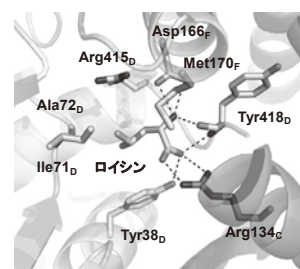
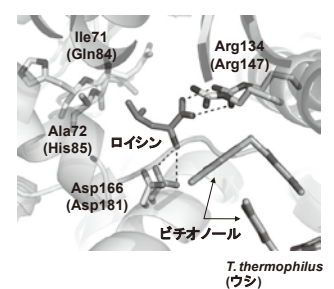
*T. thermophilus* 由来GDHのロイシン結合サイト*T. thermophilus* 由来GDHのロイシン結合サイトとウシGDHの阻害剤結合サイトの重ね合わせ

図2 GDHのロイシン結合サイト

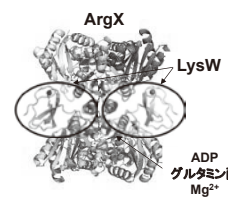
## 2. 新規リジン生合成に関わる酵素の機能・構造解析

好熱菌 *T. thermophilus* から発見された新規なリジン生合成経路の前半部分 ( $\alpha$ -ケトグルタル酸から  $\alpha$ -アミノアジピン酸への変換) はTCAサイクルの一部やロイシン生合成経路と、後半部分 ( $\alpha$ -アミノアジピン酸からリジンへの変換) はアルギニン生合成経路の一部と反応および酵素が類似しており、実際にそれらの反応をも触媒できる多機能酵素が多く存在している。このことから本生合成経路が酵素の基質特異性が分化する前の原始的な特徴を残したものであり、多くの代謝経路の進化的成り立ちを解明するための鍵となる代謝系として考えられる。筆者はそのようなリジン生合成経路の特徴とその分子機構の全貌を

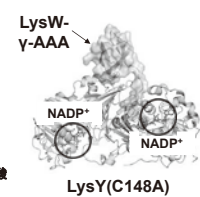
明らかにするため、構成する酵素群の結晶構造解析を行った(図3, 図4)。

初発酵素であるホモクエン酸合成酵素(HCS)はリジンによるフィードバック調節を受けることが知られている。HCSにおいては、リジンによって基質と拮抗的に活性が阻害されるため、リジンが活性中心に結合すると考えられたが、基質とは化学構造が全く異なるリジンが結合するとは考えにくく、特殊な機構が存在する可能性が示唆されていた。著者は、本酵素の基質複合体、リジン複合体の結晶構造を決定することで、酵素が活性中心構造を柔軟に変化させることにより基質ポケットに阻害剤を受け入れるという新規な阻害機構が存在することを証明した(図3)。また、リジン生合成4番目の反応を触媒するホモイソクエン酸脱水素酵素は寛容な基質特異性を有するが、本酵素を鋳型として部位特異的変異と分子進化工学的手法により生物学的活性を有する3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を創出し、その結晶構造を決定することにより新たな基質特異性の獲得機構を解明した。さらに、5番目の反応を触媒する $\alpha$ -アミノアジピン酸アミノ基転移酵素は同一活性中心において同生合成経路の中間体である $\alpha$ -アミノアジピン酸だけでなく分岐鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸、グルタミン酸等の基質を幅広く反応するが、結晶構造解析により基質認識に関わる $\alpha$ -ヘリックスの向きと側鎖構造を柔軟に変化させることにより多様な基質認識を可能にしていることを明らかにした。6番目から10番目の反応は、ごく最近発見されたアミノ基キャリアタンパク質を用いて生合成中間体を保護しながら効率的に進行するが、この反応を担う酵素群とキャリアタンパク質との複合体の結晶構造を決定することに成功し、各酵素によるキャリアタンパク質LysWの認識機構を明らかにした(図4)。本生合成システムでは、キャリアタンパク質が各酵素の間で受け渡されていく機構が存在すると予想され、解明した立体構造情報はキャリアタンパク質を用いるシステムの全貌を解明するための基盤を提示したといえる。最近、同システムは放線菌における多種の

**ArgX (*Sulfolobus tokodaii* 由来LysXホモログ)とLysWの複合体**



**LysYとLysWの複合体**



**LysKとリジンの複合体**



図4 リジン生合成経路後半の酵素の結晶構造

天然物の生合成にも利用されていることが明らかになりつつあり、この構造基盤がキャリアタンパク質を利用して生合成される多様な天然物の効率的合成や構造多様性の拡張を行う上で必須な情報として利用されることが期待される。

おわりに

本研究では微生物由来のアミノ酸代謝に関わる酵素について結晶構造解析をベースとして機能解明を行ってきた。*T. thermophilus*由来のGDHの解析を行うことにより、バクテリアにおける新規なアミノ酸センシング機構を発見し、新たな代謝調節機構の存在を示した。さらに、複雑に調節を受けるヒトGDHにも共通したアミノ酸センシング機構が存在することを示し、未だ不明な部分が多いヒトGDHの調節機構の解明につながる重要な情報を得ることができた。一方、バクテリアの新規なリジン生合成経路を構成する酵素群の網羅的な結晶構造解析を行うことにより、本経路のユニークなフィードバック阻害機構や、原始的な酵素が有する寛容な基質特異性の構造基盤、さらには新規キャリアタンパク質を利用する生合成システムの分子機構の一端について原子レベルで明らかにすることができた。

以上の結果は、アミノ酸代謝システムの機能発現および調節の分子機構に関する精密な理解を深めただけでなく、代謝経路の人為的設計のための基礎となり、今後の微生物を利用した物質生産法の開発に寄与することが期待される。

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で行われたものです。本研究を遂行するにあたり、学生時代から今日まで多大なご指導ご鞭撻を賜りました東京大学生物生産工学研究センター教授 西山真先生に心から感謝申し上げます。細胞機能工学研究室において、多大なご指導を頂きました東京大学生物生産工学研究センター准教授 葛山智久先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究に参加し、協力頂いた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の学生、研究員諸氏に感謝致します。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東支部長・西村敏英先生(日本獣医生命科学大学応用生命科学部)に厚く御礼申し上げます。

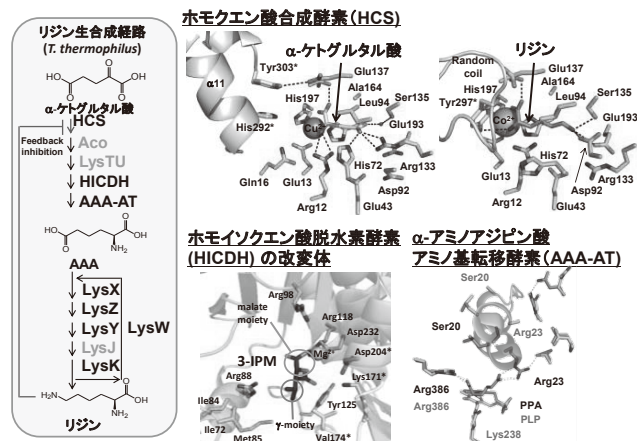


図3 新規リジン生合成経路と前半の反応を担う酵素の結晶構造