



細菌における D-アミノ酸代謝経路の解明と多機能型アミノ酸代謝酵素の発見

北里大学薬学部 宮本 哲也

はじめに

近年、細菌における D-アミノ酸はペプチドグリカンの構成成分としてだけでなく、バイオフィーム形成や遺伝子発現の制御など多種多様な生理作用を有する、生理的機能分子であるとの認識が広がっている。細菌は多様な D-アミノ酸を合成するが、これら D-アミノ酸の代謝経路に関する知見は乏しい。そこで著者は、各種細菌における D-アミノ酸代謝経路を明らかにすることを旨とし、研究を行ってきた。以下に、代表的な研究成果について紹介する。

1. 細菌における多機能型アミノ酸代謝酵素の発見

著者らは、大腸菌がペプチドグリカンの構成成分である D-アラニン (D-Ala) や D-グルタミン酸 (D-Glu) 以外の D-アミノ酸を合成していることを明らかにし、その生合成経路として、幅広い基質特異性を有するアミノ酸ラセマーゼ (YgeA) に加え¹⁾、シスタチオニン β-リアーゼ (CBL) がアミノ酸ラセマーゼ活性を有することを見出した²⁾。CBL は、細菌の L-メチオニン (L-Met) 合成経路において L-シスタチオンを L-ホモシステイン、ピルビン酸およびアンモニアへと分解する反応を触媒する酵素である。また、L-システイン (L-Cys) をピルビン酸、硫化水素およびアンモニアへと分解する活性も有する。著者らは、大腸菌が有する 2 つの CBL (MetC・MalY) が Ala を含めた 10 種類以上のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を有することを明らかにした。

さらに、CBL がセリン (Ser) をピルビン酸とアンモニアに分解する活性 (デヒドラターゼ活性) を有していることを発見した²⁾。MetC は Ser の D 体および L 体の両方を基質とし、その一方で MalY は L-Ser に対してのみ微弱なデヒドラターゼ活性を有していた。興味深いことに、MetC の Ala ラセマーゼ活性、Ser デヒドラターゼ活性およびリアーゼ活性における触媒効率 (k_{cat}/K_m) は、ほぼ同程度であった。したがって、CBL は異なる 3 種類の活性を有する多機能型アミノ酸代謝酵素であり、L-Met の生合成だけでなく、種々の D-アミノ酸の生合成お

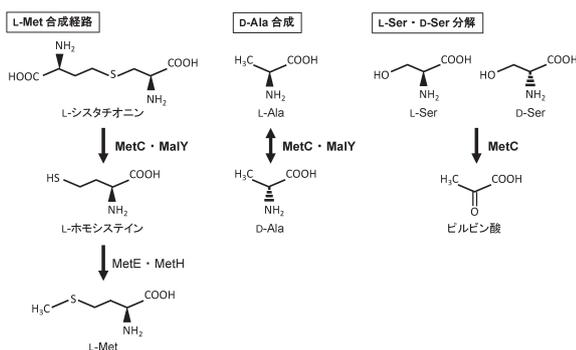


図1. CBL が触媒する 3 種類の反応

よび Ser 代謝に関与している可能性を明らかにした (図1)。

2. *Thermotoga maritima* における D-アミノ酸の代謝経路に関する研究

超好熱菌 *Thermotoga maritima* は、55℃ から 90℃ の高温環境下で生育するグラム陰性の嫌気性細菌である。この細菌のペプチドグリカンには、一般的な D-Ala と D-Glu 以外に D-リジン (D-Lys) を含むという特徴がある。ペプチドグリカン中に D-Lys を有する細菌の報告例は極めて少ない。著者らは、*T. maritima* がユニークな D-アミノ酸代謝酵素を有していることを見出した (図2)。

2.1. D-リジン合成に関与する酵素

著者らは、D-Lys 生合成を担う酵素として新規の Lys ラセマーゼを同定した³⁾。本酵素は Lys およびオルニチンに対して非常に強いラセマーゼ活性を有しており、さらに Ala を含む 8 種類のアミノ酸に対してもラセマーゼ活性を示した。これに加えて、微弱ではあるがジアミノピメリン酸 (Dpm) エピメラーゼ活性を有していることを明らかにした。また、L-Lys の前駆体となる meso-Dpm を合成する Dpm エピメラーゼを同定した³⁾。この酵素は非常に強いエピメラーゼ活性を有している一方で、微弱ながら様々なアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示すことを明らかにした。しかしながら、ラセマーゼ活性の触媒効率 (k_{cat}/K_m) は非常に低かったため、細胞内では Dpm エピメラーゼとして機能していると考えられた。以上より、*T. maritima* において D-Lys は、細菌における一般的な L-Lys 合成経路を経て、Lys ラセマーゼによって L-Lys から合成されることを明らかにした (図3)。

2.2. スレオニンデヒドラターゼ

スレオニン (Thr) デヒドラターゼは、L-イソロイシン (L-Ile) の合成経路において最初の反応を触媒する酵素である。*T. maritima* の Thr デヒドラターゼは、Ser ラセマーゼと比較的高い相同性を有しているが、Ser を含めた様々なアミノ酸に対

| 酵素 | 活性 | 触媒する主な反応 |
|---------------------------|--------------|--|
| Lys ラセマーゼ | ラセマーゼ | L-Lys ⇌ D-Lys |
| | エピメラーゼ | meso-Dpm ⇌ LL-Dpm |
| Dpm エピメラーゼ | エピメラーゼ | meso-Dpm ⇌ LL-Dpm |
| | ラセマーゼ | L-Lys ⇌ D-Lys |
| Thr デヒドラターゼ | デヒドラターゼ | L-Thr → 2-オキシ酪酸 + NH ₃ |
| アセチルオルニチン アミノトランスフェラーゼ | アミノトランスフェラーゼ | Ac-L-Om + 2-オキシグルタル酸 ⇌ L-Glu + N-アセチルグルタミン酸セミアデヒド |
| | ラセマーゼ | L-Asn ⇌ D-Asn |
| D-アミノ酸 アミノトランスフェラーゼ | リアーゼ | L-Cys → ピルビン酸 + NH ₃ + H ₂ S |
| | ラセマーゼ | D-Ala + 2-オキシグルタル酸 ⇌ D-Glu + ピルビン酸 |
| アミノトランスフェラーゼ | ラセマーゼ | L-Asp ⇌ D-Asp |

図2. *T. maritima* の各アミノ酸代謝酵素が触媒する反応

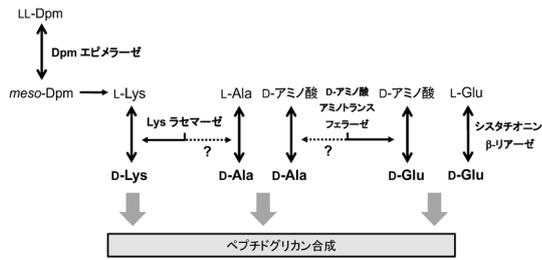


図3. *T. maritima* における D-アミノ酸合成経路

してラセマーゼ活性を示さなかった。本酵素は、L-Thr 以外に L-Ser および L-*allo*-Thr に対してデヒドラターゼ活性を示し、その一方でそれぞれの D 体には活性を示さなかった。また、L-Thr などの基質によってアロステリック制御を受ける一方で、一般的なアロステリック因子である L-バリンや L-Ile に対しては感受性が低いという特徴を有していた⁴⁾。

2-3. アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ

アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ (AcOAT) は、L-アルギニン合成経路において N-アセチル-L-オルニチン (Ac-L-Orn) 合成の役割を担う酵素である。*T. maritima* における AcOAT の最適なアミノ基ドナーとアクセプターは、それぞれ Ac-L-Orn と 2-オキソグルタル酸であった。また、アスパラギンや Ser を含む 4 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示し、さらに L-Cys に対するリアーゼ活性を有することを見出した。これら 2 つの活性はアミノトランスフェラーゼ活性よりも低いものであったが、*T. maritima* の AcOAT は異なる 3 つの活性を有する多機能型アミノ酸代謝酵素であることを明らかにした⁵⁾。

2-4. D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ

T. maritima は、細菌がほぼ普遍的に保有する Ala ラセマーゼおよび Glu ラセマーゼを有していなかった。そこで、アミノ酸ラセマーゼを介した合成経路ではなく、アミノ酸アミノトランスフェラーゼを介したもう一つの D-アミノ酸代謝経路に注目することで、新規の D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを同定するに至った⁷⁾。本酵素は 20 種類以上の D-アミノ酸に対して活性を示す一方で、L-アミノ酸に対しては一切活性を示さなかった。また、本酵素はユニークな基質特異性を有していた。すなわち、触媒効率 (k_{cat}/K_m) が最も高いアミノ基ドナーは D-Glu であったが、細胞内の D-アミノ酸としては一般的ではない D-ホモセリンと D-グルタミンに対する代謝回転数 (k_{cat}) は D-Glu より 2 倍程度高かった。また、アミノ基アクセプターとしては 2-オキソグルタル酸に対する活性が最も高かった。興味深いことに、本酵素はこのアミノトランスフェラーゼ活性に加えて、アスパラギン酸や Glu を含めた 4 種類のアミノ酸に対するラセマーゼ活性を有する多機能型酵素であった。著者らは、本酵素が生理的に D-Glu 生合成に関与するかどうかを検証するために、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の Glu ラセマーゼ遺伝子欠損株を作製し、D-Glu を含まない培地においてはその生育が顕著に低下することを確認した⁷⁾。作製した欠損株に *T. maritima* の当該遺伝子を導入した結果、その生育が野生株程

度に回復することが明らかになった⁶⁾。したがって、本酵素はアミノ酸ラセマーゼ活性を有する新奇の D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼであり、生理的に *T. maritima* の D-Glu 生合成に寄与することを明らかにした (図3)。これに加えて、*T. maritima* の CBL も同様に D-Glu 合成に寄与することを明らかにした⁶⁾。しかしながら、D-Ala の生合成経路は依然、正確に明らかとされていない (図3)。

おわりに

D-アミノ酸代謝能を有する多機能型酵素の発見は、D-アミノ酸代謝経路に新しい視点を与える。D-アミノ酸を介したバイオシステムは、細菌だけでなく哺乳類を含めた高等生物にも存在し、重要な機能に関わっていることが明らかになっている。一方で、その代謝経路や作用メカニズムは深く理解されていない。これまでに得られた研究成果が、各種生物が有する D-アミノ酸バイオシステムの解明に繋がることを期待したい。

(引用文献)

- 1) Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Homma H. Identification and characterization of novel broad-spectrum amino acid racemases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Amino Acids*, 49, 1885-1894 (2017).
- 2) Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Homma H. Cystathionine β -lyase is involved in D-amino acid metabolism. *Biochem J*, 475, 1397-1410 (2018).
- 3) Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Homma H. Elucidation of the D-lysine biosynthetic pathway in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *FEBS J*, 286, 601-614 (2019).
- 4) Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Sakai-Kato K, Homma H. Identification and biochemical characterization of threonine dehydratase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Amino Acids*, 53, 903-915 (2021).
- 5) Miyamoto T, Saitoh Y, Katane M, Sekine M, Sakai-Kato K, Homma H. Acetylornithine aminotransferase TM1785 performs multiple functions in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett*, 595, 2931-2941 (2021).
- 6) Miyamoto T, Moriya T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Sakai-Kato K, Oshima T, Homma H. Identification of a novel D-amino acid aminotransferase involved in D-glutamate biosynthetic pathways in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *FEBS J*, 289, 5933-5946 (2022).
- 7) Miyamoto T, Moriya T, Homma H, Oshima T. Enzymatic properties and physiological function of glutamate racemase from *Thermus thermophilus*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1868, 140461 (2020).

謝辞 本研究の大部分は、北里大学薬学部分析化学教室 (旧生体分子解析学教室) にて行われたものです。終始ご指導ご鞭撻を賜りました本間浩先生 (北里大学名誉教授) に心より感謝申し上げます。日頃よりご支援いただきました分析化学教室 (旧生体分子解析学教室) の先生方ならびに学生の皆様に深く感謝申し上げます。また、本研究の発展にご協力いただきました、共同研究者の皆様に感謝申し上げます。最後に、学生の頃からご指導を賜り、また本奨励賞にご推薦くださいました正木春彦先生 (東京農業大学客員教授・東京大学名誉教授) に心より感謝申し上げます。