

微生物が有する代謝酵素の分子および動力学的な多様性の解明



理化学研究所環境資源科学センター 千葉洋子

はじめに

ゲノム情報の蓄積により、遺伝子の比較解析を用いて各生物の有する代謝・酵素を予測することが可能となった。一方で、以下に具体例を示すように、ゲノム上でその生物の生理条件からあるはずの代謝経路・酵素が推定できないことがあることも示された。これは既知のそれとは遺伝的・進化系統的に異なる酵素を用いている、もしくは異なる経路を用いていることを示唆する。すなわち、ゲノム情報は既知の代謝経路・酵素の有無だけでなく、新規システムが存在する可能性も示してくれる。

我々は相同性検索により推定することのできない新規代謝酵素を生化学的に同定し、同じ機能を有する酵素に起源の異なる複数タイプがあること、すなわち遺伝的多様性があることを明らかにしてきた。さらにその理由を探る過程で、分子的な多様性に加えて動力学的な多様性も存在することに注目し、その理由を明らかにすることにも挑んできた。ここでは、これまでに得られた研究成果の中から代表的なものを紹介する。

1. セリン生合成酵素の遺伝的多様性の発見

アミノ酸は細胞構成成分およびエネルギー源として重要である。タンパク質を合成する20種類のアミノ酸の中で、セリン生合成経路はゲノム情報から推定することが難しいことが知られている¹⁾。すなわちセリン生合成能力を有しているハズなのに有さない(=経路を推定できない)と誤判定されてしまう種が多く存在するのだ。その理由の一つとして、セリン生合成に関わる酵素の遺伝的多様性が高いことが挙げられる。

多くの生物において、セリンは糖代謝の中間代謝産物である3-P-glycerateから3つの反応を経て作られる。これらの反応を触媒する酵素はそれぞれ相同性を有する1種類ずつのみが知られていた。ところが微生物の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)遺伝子を欠く種が多数存在することが示された²⁾。そこでそれら生物種の中から、増殖生理上セリン生合成能力を有することが明白で、かつゲノム情報から代替のセリン生合成経路が推定されない種を選定し、セリン生合成経路・酵素を実験的に特定した。

1-1. Type 2 PSP の発見

Aquificota門に属する好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* は、CO₂からすべての細胞構成成分を合成できる独立栄養性細菌であることから、セリン生合成経路を有することは自明である。しかし、本菌は既知の PSP (Type 1 と呼ぶ) 遺伝子ホモログを欠き、ゲノム情報からセリン生合成経路を推定することができなかった。一方で本菌の細胞破碎液からは PSP 活性が検出されたので、type 1 PSP との相同性を欠く新規な PSP を有し、これを用いてセリンを生合成している可能性が示唆された。本仮説を検証するため、本菌の細胞破碎液から活

性を指標に PSP 活性を有するタンパク質を精製し、同定した。本 PSP は type 1 PSP とは Superfamily レベルで異なるものだった²⁾ので、type 2 PSP と名付けた。さらに、本遺伝子の破壊株はセリン要求性を示した³⁾ことから、本新規 PSP が実際にセリン生合成に必須であることが示された。Type 2 PSP ホモログは、type 1 PSP を欠くシアノバクテリア等にも存在し⁴⁾、これら生物でもセリン生合成に寄与していると推定される。

1-2. Type 3 PSP の発見

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* は従属生物であるが、合成培地での増殖生理からセリン生合成能を有することが明白である。本菌は3ステップのセリン生合成経路の最初の2酵素の候補遺伝子を有するが、type 1, 2 PSP 遺伝子候補を欠く。そこで *H. thermophilus* と同様に PSP 遺伝子を同定し (Type 3 PSP)、セリン生合成に必須であることを証明した⁵⁾。

2. 触媒化学と酵素化学の融合による酵素・代謝進化原理の抽出

2-1. PSP には動力学的な多様性もある

以上の研究から生物は PSP を少なくとも 3 回「発明」したことが示された。なぜ PSP には遺伝的・分子的な多様性があるのだろうか。本問に答える方法を考慮する過程で、PSP のミカエリス・メンテン定数 (K_m) には 3 衡もの多様性がある⁶⁾ことに気付いた。そこで K_m の多様性が何を意味するのか明らかにすることを目指し、以下の研究を行った。

2-2. K_m の多様性が意味すること: 理論解析

酵素速度論の基本であるミカエリス・メンテン式によると、 K_m が小さく、 k_{cat} が大きいほど反応速度が大きくなる。 K_m は基質と酵素の親和性を表し、その値が小さいほど両者が強く結合する。しかし、基質と酵素が強く結合すると、生成物が酵素から離れにくくなり、反応が進みにくくなると推定される。実際、人工触媒の分野では基質と触媒の吸着エネルギーが小さすぎず「ほどほど」の時に反応速度が最大となる経験則 (サバティエ則)⁷⁾ が知られている。さらに近年、欧州のグループによってセルラーゼ活性がサバティエ則に従うことが報告された⁸⁾。もし PSP を含む他の酵素もサバティエ則に従うのであれば、 K_m が基質濃度に対して最適化されている可能性があるのではないかと候補者らは推定し、以下の研究を行った。

まず、生化学および物理化学の知見を融合することで、活性

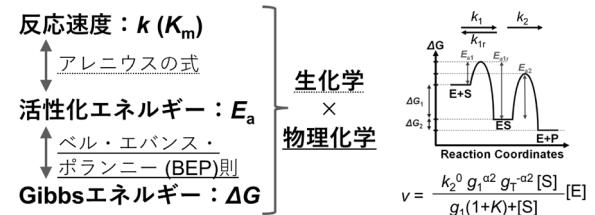


図1. 酵素反応速度とギブスエネルギー変化の関係式

化エネルギーを介して酵素反応速度とギブスエネルギー変化の関係を数式化した(図1)⁹。その結果、いくつかの仮定のもとにおいて、 K_m と k_{cat} のトレードオフを理論的に記すことに成功し、 K_m を限界まで小さくするのではなく、基質濃度と同じくした時に酵素活性が最大になることが示された。

さらに、既存のオミックス情報との照合によりほ乳類細胞、酵母、大腸菌の細胞内基質濃度と、各生物の有する酵素の K_m の関係を調べたところ、多くの酵素が基質濃度に近い K_m を有することが明らかになった(図2)⁹。本結果は、進化の過程で基質濃度に近い K_m を有する酵素が選択されてきた、さらには活性の高い酵素が選択されてきた可能性を示唆する。

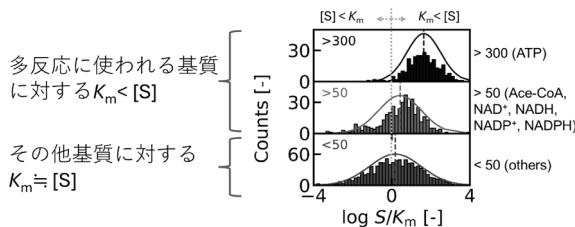


図2. 細胞内基質濃度とその基質に対する K_m の関係

2-3. K_m の多様性が意味すること:PSPの解析

では、PSPの K_m の多様性はその酵素を有する生物における基質(phosphoserine)濃度に対する活性の最適化によるものなのだろうか？答えはおそらく否である。なぜなら、少なくとも我々が解析した10生物由来のPSPについて、基質濃度を変化させても最大活性を示す酵素(K_m)は変化しなかったからである(図3)⁶。この理由を実験と理論により解析したところ、PSPではセルラーゼと比較して酵素ごとの活性化エネルギーの違いが大きいことが一因であることが明らかとなった⁶。

2-4. PSPの解析がもたらした高活性酵素設計のヒント

以上の研究成果は、高活性な酵素を作る指針、すなわち k_{cat} を大きくし K_m を小さくするという既存の概念に再考をもたらす。具体的には、 K_m が「中間的な値」の時に活性は最大化し、対象酵素がサバティエ則に従う($\approx k_{cat}$ と K_m にトレードオフがある)場合は K_m を反応環境における基質濃度に近づけることが好ましい。さらに、将来的に対象酵素の活性化エネルギーを制御することができるようになれば、 K_m と k_{cat} のトレードオフを破るさらなる高活性酵素を設計できると期待される。

おわりに

紹介したPSPの分子(遺伝)的な多様性は、非モデル生物を含む系統的・生理的に多様な生物・酵素を対象としたことで初めて達成された。なぜならモデル生物であるヒト・植物・酵母・大腸菌はいずれもtype 1 PSPを有するので、他のタイプのPSPの存在は我々が水素細菌で研究するまで見逃されていたのだ。さらに、我々が発見した活性化エネルギーの多様性も、3ドメインすべての生物に分布し、機能する環境も常温～85°Cと多様である酵素PSPを用いて解析したことが肝であったと考えられる。(なお、セルラーゼ活性は、カビ由来およびその変異体のみを用いて解析されている。)候補者がこれまで長年行ってきた酵素多様性の解明は、酵素工学等へ展開される可能性を秘めており、基礎と応用をシームレスにつなぐ農芸化

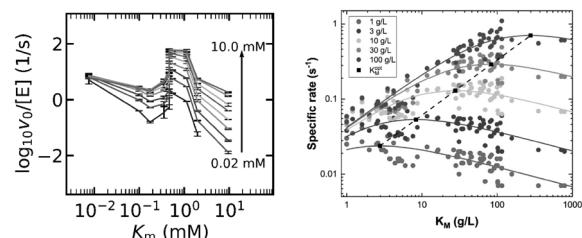


図3. PSP(左)⁶とセルラーゼ(右)¹⁰における基質濃度と K_m に対する活性変化の違い

学的な研究であると自負している。

(引用文献)

- 1) Ramoneda, J. et al. Taxonomic and environmental distribution of bacterial amino acid auxotrophies. *Nat Commun*, 14, 7608 (2023).
- 2) Chiba, Y. et al. Discovery and analysis of cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homologs as novel phosphoserine phosphatases in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Biol Chem*, 287, 11934–11941 (2012).
- 3) Kim, K.T. et al. Phosphoserine phosphatase is required for serine and one-carbon unit synthesis in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Bacteriol*, 199, e00409–e00417 (2017).
- 4) Chiba, Y. et al. Structural units important for activity of a Novel-type phosphoserine phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 revealed by crystal structure analysis. *J Biol Chem*, 288, 11448–11458 (2013).
- 5) Chiba, Y. et al. Discovery and analysis of a novel type of the serine biosynthetic enzyme phosphoserine phosphatase in *Thermus thermophilus*. *FEBS J*, 286, 726–736 (2019).
- 6) Chiba, Y. et al. Rationalizing the influence of the binding affinity on the activity of phosphoserine phosphatases. *Angew Chem*, 63, e202318635 (2024).
- 7) Sabatier, P. Hydrogénations et déshydrogénations par catalyse. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 44, 1984–2001 (1911).
- 8) Kari, J. et al. Sabatier principle for interfacial (heterogeneous) enzyme catalysis. *ACS Catal*, 8, 11966–11972 (2018).
- 9) Ooka, H. et al. Thermodynamic principle to enhance enzymatic activity using the substrate affinity. *Nat Commun*, 14, 4860 (2023).
- 10) Kari, J. et al. Physical constraints and functional plasticity of cellulases. *Nat Commun*, 12, 3847 (2021).

謝 辞 本研究は、東京大学大学院在学時に着手し、海洋研究開発機構および理化学研究所で発展させたものです。在学中に今に続く研究テーマに出会う機会を与え、ご指導くださった応用微生物学研究室の五十嵐泰夫先生、石井正治先生、新井博之先生、亀谷将史先生に深く感謝いたします。また、触媒化学・物理化学の視点から酵素や代謝を解析するという新たな研究展開のきっかけをくださった理化学研究所の中村龍平チームリーダーおよび大岡英史研究員に心より御礼申し上げます。なお、本研究を行うにあたりこちらには書ききれない多くの皆様のご協力やご支援をいただきました。共同研究者および理研・生体機能触媒研究チームの同僚を筆頭に、日々研究活動を支えてくださる皆さまに改めて感謝の意を示します。