

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士課程 進学

氏 名 小橋 信行
指導教官 山根 久和

論文題目

Thermus 属細菌におけるリジン生合成系及び aspartate kinase の構造と機能に関する研究

はじめに

Aspartate kinase (AK) はスレオニン、メチオニン、リジンなど、複数のアミノ酸の生合成経路における共通の初発酵素としてアスパラギン酸をリン酸化する反応を触媒する酵素である。AK は最終産物であるアミノ酸の生体中の濃度によって転写レベルと酵素活性レベルの二重の制御を受けることが知られている。この制御の実現に関してはまさに多種多様であり、例えば *B. subtilis* は三種の AK を所持することが示唆されており、I はジアミノピメリン酸、II はリジン、III はリジンとスレオニンにより酵素活性レベルの制御を受けることが知られている。一方、*Corynebacterium* ではリジン、スレオニンにより酵素活性レベルの制御を受ける唯一つの AK しか所持していない。このように生合成系の最終産物による活性の制御は feed back 制御といわれ、生物が必要なものだけを生産するための合理的な仕組みであり、アミノ酸生合成系の初発酵素には一般的に広く見出される。

Corynebacterium の AK、*Bacillus* の AK III などはリジン・スレオニンがともに存在するときのみ強い酵素活性阻害を受ける。協奏的酵素活性阻害は数多くの酵素に関する論文の中でもこれら AK の一部にのみ知られている現象であり、非常に興味深い。協奏的酵素活性阻害のメカニズムとしてはアロステリックな構造変化が一般的に挙げられており、かつ、その構造変化はロングレンジで多段的であるものと思われる。このような観点から、協奏的阻害のメカニズムに関する研究は、多くの酵素活性制御メカニズムの中で一つのメカニズムを解明するというだけにとどまらず、複雑な相互作用が絡み合うシグナル伝達や遺伝子の転写制御のメカニズムについても示唆を与えると考えられる。

また、上記のような学術的な興味深さだけでなく AK は応用面でも非常に興味深い研究対象である。現在、リジンなどのアミノ酸は廃糖蜜などを原料に用いた微生物発酵法により製造されており、家畜の飼料への添加、点滴用の栄養剤、健康食品などに幅広く利用されている。特にリジン発酵において AK の制御応答不活化の重要性が高いことが知られている。AK はこのように基礎応用両面において興味深い研究対象であるが、その一方で AK 活性発

現やその機能調節のメカニズムについては殆ど研究されてこなかった。

本研究は *T. flavus* 及び *B. subtilis* 由来の AK を対象として、その活性発現及び機能調節のメカニズムを明らかにすることを目的に行ったものであり、その過程で、*Thermus* 属細菌においてはリジンが AK を介さないまったく独立した経路で生合成されることも見出した。本論文は以下の三章により構成される。

1. *T. flavus* 由来 AK のタンパク質工学的手法を用いた解析

高度好熱性細菌 *T. flavus* 由来の AK の遺伝子を *lac* プロモーターの制御下、大腸菌において大量の AK を生産させることに成功した。熱処理・硫酸沈殿・ゲルろ過のわずか三段階によって目的産物のみ完全精製する方法を確立し、11 の培養から 100 mg を超える大量の AK の精製が可能となった。ゲルろ過を用いた分子量検定の結果、AK としては初めて $\alpha_4\beta_4$ のサブユニット構成をとることが明らかとなった。PCR を用いた部位特異的変異により AK 間でよく保存されているアミノ酸残基 29 残基についてアラニンまたはロイシンに置換した変異体を作製し、これら変異体 AK の酵素学的解析を行った。これらの結果から Thr47 はアスパラギン酸の結合に、Lys7 及び Glu74 は活性発現に関わることが強く示唆された。一方で単独の変異が ATP の結合に大きく影響しているものは見出せなかった。AK は二価金属であるマグネシウム(Mg)を要求することから、各変異体の Mg 依存性を測定した。その結果、Ser41、Thr47、Asp154、Asp182 の各残基が高い Mg 濃度を要求することが明らかとなり、これらの残基が活性発現に必要な Mg の結合に関与することが示唆された。本研究は AK における保存アミノ酸残基の役割の一部を初めて明らかにしたものであり、この結果は AK の構造・機能相関を解明する重要な手掛かりを与えるものと期待される。

2. *B. subtilis* AK III の解析

B. subtilis においてその詳細は調べられていないもののリジン・スレオニンにより協奏的阻害を受ける第三の AK である AK III が存在することが示されていた。*B. subtilis* のゲノムプロジェクトにより *yclM* と命名された遺伝子は AK と高いアミノ酸配列の相同性を有するものの、その実体に関しては解析されていなかった。私は *yclM* が AK III をコードすると考え、同遺伝子のクローン化及び遺伝子産物の機能解析を行った。プラスミドにクローン化した *yclM* 遺伝子を全ての AK 遺伝子を破壊した大腸菌において発現したところ、遺伝子の塩基配列から推測される分子量 50 k 付近に大量のタンパク質の生産が認められ、且つその細胞抽出液に AK 活性が検出された。また、部分精製した YclM はリジン・スレオニンにより協奏的阻害を受けることが明らかになったことから、*yclM* 遺伝子が AK III をコードすると結論した。この AK III は 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液中において非常に不安定であったため安定化剤の探索を行ったところ、500 mM の硫酸アンモニウム存在下において顕著な失活は見られなくなった。ゲルろ過による分子量推定では分子量約 50 k と推定され、サブユニット構成はモノマーであることが示唆された。これまで、リジン・スレオニンによる協奏的阻害を受けることが明らかになっている *Corynebacterium* の AK は $\alpha_2\beta_2$ のヘテロテトラマーであり、 β サブユニットが活性調節に強く関わることを示唆されている。複数のサブユニットが複雑に構造変化することにより協奏的阻害が生じると予想され構造の複雑さが活性調節機構解明の一つの障害になっていたが、単一ポリペプチドからなる *B. subtilis* の AK III は協奏的阻害を示すシンプルなモデルとなりうることから活性調節機構の解明のためにおおいに貢献できるものと期待される。

3. *T. thermophilus* におけるリジン生合成系に関する研究

カビ・酵母を除いてリジンはアスパラギン酸からジアミノピメリン酸 (DAP) を経由して生合成される。AK はこの生合成系の始めに位置する酵素であり、リジンだけでなくスレオニン、メチオニン、イソロイシンなどの生合成にも関わっている。他の生合成系と同じく、

これらの生合成も最終産物や中間物によってその流量が制御されている。ところが、高度好熱性細菌 *T. thermophilus* はただ一種類の AK しか有しておらず、その活性もスレオニンによってのみ阻害を受けることが分かった。*T. thermophilus* におけるアスパラギン酸族アミノ酸生合成に AK がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため AK001 と名づけた AK 欠損 *T. thermophilus* を作製した。AK001 株は野生型と異なり最小培地では生育できず、スレオニンとメチオニンの添加により生育が回復した。しかし、予想に反してリジンは生育にまったく影響を与えなかった。このことより、*T. thermophilus* においてはリジンが DAP 経路とは別の経路で生合成されることが示唆された。そこでリジン要求変異株を薬剤によるランダム変異により作製したところ、全ての変異株はリジン添加によってその生育が回復したが DAP では回復しなかった。そこでカビ・酵母のリジン生合成経路である α -アミノアジピン酸 (AAA) 経路の中間体である AAA を添加してみたところ一部の変異株において生育の回復が観察された。一方、リジン要求性変異株の欠損を相補する 4.35 kbp の *Bam*HI ゲノム断片をクローン化しその塩基配列から予想されるアミノ酸配列を用いて BLAST による相同性検索を行ったところ、同 DNA 断片にはホモアコニット酸ヒドラターゼと相同性のある ORF が存在することが明らかとなった。同遺伝子を破壊した変異株はリジン要求性を示した。また、この栄養要求性は AAA の添加によっても回復した。これまで原核生物の全てにおいて DAP 経路でリジンが生合成されると認識されてきたが、本研究の結果、*T. thermophilus* においては AAA 経路によってリジンが生合成されることが示唆された。

相同性検索の結果、今回取得したクラスターが *Pyrococcus* においても見出された。このことは、AAA 経路が原核生物、Archea を含めた三大生物界全てに存在することを意味する。AAA 経路の前半部分は TCA 回路の一部の酵素群とも相同性が高く、共通の祖先より進化したものと考えられる。加えて、今回発見された AAA 経路を構成する酵素群はアルギニン生合成に関わる酵素群と非常に高い相同性を持つことがわかった。アルギニン前駆体であるオルニチンとリジンは炭素鎖が 1 鎖長違う相同化合物であり、AAA 以降の反応がアルギニン生合成類似であることが示唆された。本研究で見出されたリジン生合成系はアミノ酸をはじめとするいくつかの主要代謝経路の形成・進化を解明するための鍵となる可能性を秘めた重要な発見として注目されつつある。