

# 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏名 : Asri Peni Wulandari

指導教官名: 山根 久和

**Studies on the structure and function of homocitrate synthase, a key enzyme in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus* HB27**  
(*Thermus thermophilus* HB27 のリジン生合成における鍵酵素、ホモクエン酸合成酵素の構造と機能に関する研究)

*Thermus thermophilus* HB27 株は 70°C 付近で最適に生育する高度好熱性細菌である。殆どの細菌においてリジンはアスパラギン酸からジアミノピメリン酸経路によって合成されると考えられてきた。しかし、*T. thermophilus* においては、カビや酵母にみられるリジン生合成経路の前駆体である、 $\alpha$ -アミノアジピン酸を経てリジンが合成されることが最近になって発見された。[1][2] その生合成は 2-oxoglutarate と Acetyl-CoA からホモイソクエン酸の合成で開始し、 $\alpha$ -アミノアジピン酸までの合成は、ロイシン生合成や TCA サイクルの一部と類似した経路で進行する。それぞれの生合成、代謝系で対応する酵素の間でアミノ酸配列の相同性が見出されることから、*Thermus* のリジン生合成に関連する酵素とロイシン生合成やアルギニン生合成に加え、TCA サイクルの一部に関連する酵素の間に進化的な関連性があることが示唆されている。[3] これらの事実は、*Thermus* のリジン生合成はアミノ酸生合成や関連した代謝系の進化を解明するための鍵となり得ることを意味していると考えられる。一方、アミノ酸の生合成は、過剰量の経路最終産物による酵素活性の阻害、feedback-inhibition によって流量調節されることが知られているが、そのターゲットとなるのが多くの場合、経路の初発酵素である。下等真核生物のリジン生合成においては、その第一段階の反応である 2-oxoglutarate と acetyl-CoA からホモクエン酸の合成を触媒する homocitrate synthase(HCS)がリジンによって制御される事が知られている。上述した通り、*Thermus* のリジン生合成の前半部分は下等真核生物のリジン生合成と、後半部分はアルギニン生合成の一部とそれぞれ類似している。従って、*Thermus* の HCS が

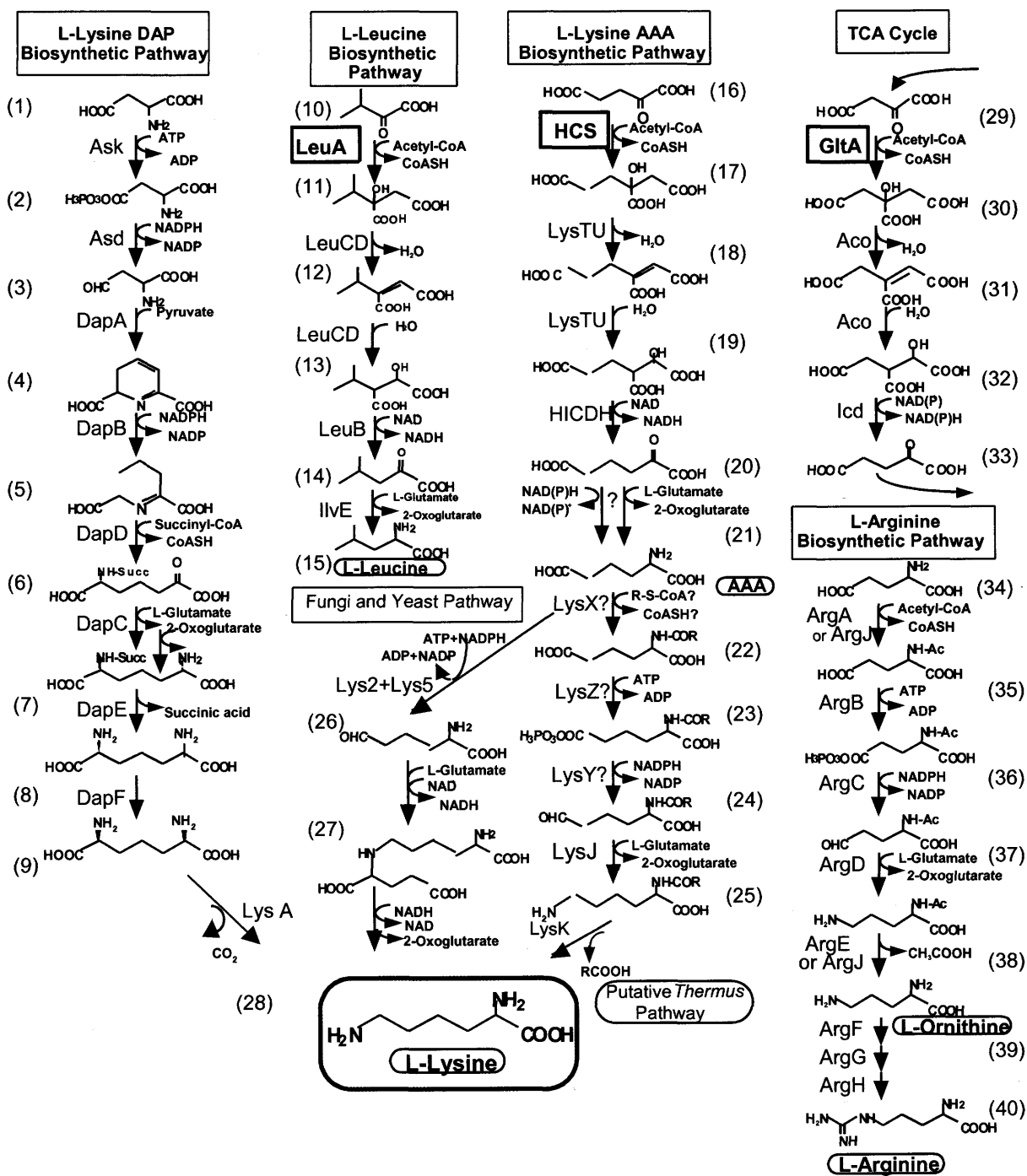


Fig. I L-lysine biosynthetic pathways and related biosynthetic pathways.

(1) L-aspartate, (2) L-aspartyl-phosphate, (3) L-aspartyl-semialdehyde, (4) L-dihydropicolinate, (5) L-tetrahydropicolinate, (6) N<sup>2</sup>-succinyl-L-2-amino-6-oxopimelate, (7) N<sup>2</sup>-succinyl-L,L-diaminopimelate, (8) L,L-diaminopimelate, (9) D,L-diaminopimelate, (10) 2-oxoisovalerate, (11) isopropyl-L-malate, (12) dimethylcitrate, (13) 3-isopropyl-L-malate, (14) 2-oxoisocaproate, (15) L-leucine, (16) 2-oxoglutarate, (17) homocitrate, (18) homoaconitate, (19) homoisocitrate, (20) 2-oxoadipate ( $\alpha$ -keto adipate), (21)  $\alpha$ -aminoadipate, (22) N<sup>2</sup>-acetyl-L-aminoadipate semialdehyde, (23) N<sup>2</sup>-acetyl-L-aminoadipate- $\delta$ -phosphate, (24) N<sup>2</sup>-acetyl-L-aminoadipate- $\delta$ -semialdehyde, (25) N<sup>2</sup>-acetyl-L-lysine, (26)  $\alpha$ -aminoadipate semialdehyde, (27) L-saccharopine, (28) L-lysine, (29) 2-oxoacetate, (30) citrate, (31) aconitate, (32) isocitrate, (33) 2-oxoglutarate, (34) L-glutamate, (35) N<sup>2</sup>-acetyl-L-glutamate, (36) N<sup>2</sup>-acetyl-L-glutamyl- $\gamma$ -phosphate, (37) N<sup>2</sup>-acetyl-L-glutamate-semialdehyde, (38) N<sup>2</sup>-acetyl-L-ornithine, (39) L-ornithine, (40) L-arginine

どのような調節を受けるのかは大変興味深い。本研究で、私は *T. thermophilus* における  $\alpha$ -アミノアジピン酸を経るリジン生合成の調節機構の情報を得るために、ホモクエン酸の合成を触媒する HCS の特性解析を行った。

### 1. リジン生合成に関連するホモクエン酸の特性解析

組換え *E. coli* で生産された *Thermus* HCS を、Ni-NTA resin 等を用いて精製した。この精製サンプルを用いて、HCS の酵素学的な性質を解析した。種々の温度における酵素活性を測定することで、活性と温度の相関を決定した結果、60°C 周辺に至適温度を有する bell-shape 型の profile が得られた。反応温度が上昇するにつれて化学反応はより速い速度で進行することを考慮すると、70°C 以上での活性の減少は HCS の変性によるものであると考えられる。耐熱性を調べたところ、HCS は 70°C 以上では失活していた。より詳細に *Thermus* HCS の特性解析を行うために、酵素の動力学的解析を行った。その結果、2-oxoglutarate 及び acetyl-CoA に対する  $K_m$  値はそれぞれ 44  $\mu$ M、32  $\mu$ M であった。

**Table 1. Kinetic analysis of HCS for keto-acids and Acetyl-CoA.**

Substrate	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )
2-Oxoglutarate	44 $\pm$ 5	(117 $\pm$ 2) <sup>a</sup>	(2.7 $\times$ 10 <sup>6</sup> ) <sup>a</sup>
Acetyl-CoA	32 $\pm$ 6	183 $\pm$ 19	5.7 $\times$ 10 <sup>6</sup>
Oxaloacetate	255 $\pm$ 60	115 $\pm$ 7	4.5 $\times$ 10 <sup>5</sup>
Acetyl-CoA	28 $\pm$ 5	115 $\pm$ 6	4.1 $\times$ 10 <sup>6</sup>
2-Oxoisovalerat	N.D.	N.D.	

<sup>a</sup>;  $k_{cat}$  value was underestimated because saturating amount of acetylCoA could not be added due to the inhibition by the compound.

アミノ酸生合成において殆どの場合、生合成経路の第一段階において制御を受けることから、リジン及び関連化合物を HCS 反応溶液に添加し、活性に対する影響を観察した。その結果、HCS はリジンによって顕著に阻害されることが明らかになった。その阻害様式を調べたところ、リジンによる阻害は 2-oxoglutarate と拮抗的であり、 $K_i$  値は 9.5  $\mu$ M と算出された。次に HCS 活性に対する影響を他の構造類似化合物 7 種類について調べた結果、その内の 2 種類、アルギニンと 2-aminoethylcysteine がリジンをういた際と比較すると、弱いながらも HCS 阻害効果を示した。HCS のアミノ酸配列を用いて相同性解析したところ、唯一 LeuA が相同性を示すものとして検索された。LeuA はロイシン生合成酵素の 1 つであり、2-oxoisovalerate と acetyl-CoA から 2-isopropylmalate の合成を触媒するロイシン生合成経路の初発酵素である。アミノ酸配列の相同性にも関わらず、HCS は 2-oxoisovalerate に対する活性を全く示さなかった。[Table1] 一方、クエン酸合成酵素は TCA サイクルに属する酵素であり、oxaloacetate と acetyl-CoA からクエン酸を合成する。興味深いことに、基質の構造同様にその反応機構においても類似性が

予想されるにも関わらず、クエン酸合成酵素は HCS や LeuA との間でアミノ酸配列における類似性を示さない。HCS 反応液に 2-oxoglutarate の代わりに oxaloacetate を用いて反応を行った場合、KCl 非存在下では活性が検出されなかったが、KCl 存在下では明らかな活性が検出された。Oxaloacetate 及び acetyl-CoA に対する  $K_m$  値はそれぞれ 255  $\mu$ M、28  $\mu$ M、 $K_{cat}$  値は 115  $\mu$ M であった。

## 2. *Thermus* HCS の部位特異的変異

HCS の基質認識を明らかにするため、種々の HCS 間に高く保存されている His67, His105, Pro156, Arg160, Gly161 のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した。基質として 2-oxoglutarate(2OG), oxaloacetate(OAA), 2-oxoisovalerate(2OIV)を用い、基質特異性を解析した。前述したとおり、*Thermus* HCS は 2OIV を基質とした反応を行うことは出来ないが、R160T 変異体は 2OG, OAA に対して触媒活性の減少を示すものの、2OIV に対する明らかな活性を示すことが明らかとなった。このアルギニン残基は全ての HCS において保存される一方で、LeuA(2-isopropylmalate synthase)においては対応する部位にはスレオニンが位置している。これらの結果は、R160 が基質特異性を決定する重要な残基であり、おそらくは 2OG の 5 位カルボン酸を認識する役割を担っていることが示唆された。また、他の変異体では全ての基質に対して  $K_m$  値、 $K_{cat}$  値において様々な変化が観察された。これらのアミノ酸残基もまた基質認識、触媒活性に関わる残基であるものと予想され、その詳細について解析を行っているところである。

## 3. *Thermus* HCS 結晶化の試み

*Thermus* HCS の構造機能相関を理解するためには、立体構造の情報が必要である。HCS の立体構造を決定するために、HCS の結晶化を試みている。野生型 HCS 及び R160T 改変酵素を対象として、20℃、沈殿剤 polyethylene glycol 6000 存在下、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって、小さいながらも形が整った octagonal (bi-pyramidal)な結晶が得られた。得られた結晶はまだ X 線結晶構造解析を行うことが出来る程のものではなかったが、結晶化条件の最適化を行うことで、X 線結晶構造解析に適した結晶に近い将来得られるものと期待している。

### References:

- [1] Kosuge, T. and Hoshino, T. (1998) FEMS Microbiol Lett. 169, 361-367.
- [2] Vogel, H.J. (1964) Am. Nat. 98, 446-455.
- [3] Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T. and Yamane, H. (1999) Genome Res. 9, 1175-1183.
- [4] Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M. and Yamane, H. (2002) FEBS Lett. 512, 269-274.
- [5] Wulandari, A.P.; Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., Hoshino, T., Yamane, H. (2002) FEBS lett. 522. 35-40.