

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成13年度博士課程進学

氏名 宮崎 淳一

指導教官名 西山 真

## 論文題目

### 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成酵素の特性と進化に関する研究

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株は峰温泉で単離された高度好熱性の真正細菌であり、70°Cで至適に生育する。本菌は高温で生育するという極めて特異な特徴や遺伝子工学的手法が適用できる点から生化学あるいは分子生物学の分野で基礎的に幅広く研究されているのに加えて、耐熱性酵素の資源として応用的にも高く注目されている。

アミノ酸であるリジンの生合成経路には、真正細菌や植物にみられるジアミノピメリン酸 (DAP) を経由する DAP 経路と酵母及びカビにみられる  $\alpha$ -アミノアジピン酸 (AAA) を経由する AAA 経路の2つの経路が知られている。しかしながら、私の所属する研究室において *T. thermophilus* HB27 株は真正細菌に属するにもかかわらず AAA を経てリジン生合成を行っていることが見いだされた [1]。さらに、本リジン生合成に関わる5つの酵素をコードすると予想される7つの遺伝子で構成されるクラスターのクローニングに成功し、その配列解析の結果から、AAA 以前のリジン生合成は酵母及びカビの生合成と同様にロイシン生合成及び TCA cycle の一部と類似していること、そして AAA 以降は酵母及びカビのそれとは異なるアルギニン生合成と類似していることが推定された [2]。

こうした研究により、本菌におけるリジン生合成は9つの酵素反応によって構成されることが推定されたが、そのうちの4つの反応を触媒する酵素遺伝子が既にクローン化されている遺伝子クラスターに欠けていることがわかった。本リジン生合成の代謝・調節機構の全貌を明らかにするためには、これら酵素遺伝子のクローニングに加えて、本生合成に関わる酵素の特性解析を行うことが必要不可欠であると考えられた。

本研究では、このリジン生合成の全貌を解明するために、クローニングされてなかった4つの反応を触媒する酵素の遺伝子のうち3つの遺伝子 (*lysJ*, *lysK*, *hicdh*) のクローニング、ノックアウト及びその遺伝子産物である酵素の特性解析を行った。また、その中の1つ homoisocitrate dehydrogenase (HICDH) に関しては、部位特異的変異導入法及び X 線結晶構造解析による基質認識機構の解明を試みた。本研究ではこれらの生化学、構造生物学及び進化系統学的解析を通じて、本リジン生合成をはじめロイシン生合成、アルギニン生合成及び TCA cycle の一部等の進化的に同一起源を有する生合成代謝系がどのように形成され進化的に分岐していったのかという疑問に対してアプローチしていくことも主要な目的の1つとした。

## I. Functional and evolutionary relationship between arginine biosynthesis and prokaryotic lysine biosynthesis through $\alpha$ -aminoadipate

*T. thermophilus* HB27 株のリジン生合成関連酵素遺伝子クラスターには、本生合成最終2段階の反応を触

媒すると考えられる酵素をコードする遺伝子が欠けていることがわかった。そこで、私はこの最終2段階の酵素をコードすると考えられる遺伝子のクローニングを試みた。

リジン生合成最終2段階の反応を行う酵素はアルギニン生合成において相当する反応を担う ArgD(*N*<sup>ε</sup>-acetylornithine aminotransferase) 及び ArgE(*N*<sup>ε</sup>-acetylornithine deacetylase) と類似したアミノ酸配列を有することが推測された。この推測をもとに *argD* 遺伝子 homolog のクローニングに成功すると同時に、クローン化した *argD* homolog の下流に *argE* 遺伝子 homolog が存在していることをみいだした。これら遺伝子のリジン生合成への関与を解析するために、*T. thermophilus* HB27 株のそれぞれの遺伝子に対するノックアウト変異株を作製した。変異株の栄養要求性を解析したところ、*argD* homolog のノックアウト変異株は最少培地においては生育しなかったが、リジンを添加することによって生育が回復した。一方、*argE* homolog のノックアウト変異株は最少培地において若干の生育がみられたものの、リジンを添加することによって明らかに生育の向上がみられた。以上のことから、これら2つの遺伝子は本菌のリジン生合成に必須であることが明らかとなり、それぞれ *lysJ*、*lysK* と名付けた。

続いて、両遺伝子をそれぞれ大腸菌を用いて発現、精製を行い、特性解析を行った。*LysJ* の反応速度論的な解析を行った結果、大変興味深いことに本来のリジン生合成の生成中間体と推定される *N*<sup>ε</sup>-acetyllysine よりもアルギニン生合成の生合成中間体である *N*<sup>ε</sup>-acetylornithine に対して16倍も効率よく基質としてアミノ基転位活性を示すことがわかった。一方、*LysK* に関しては本来のリジン生合成の生合成中間体と推定される *N*<sup>ε</sup>-acetyllysine とアルギニン生合成の生合成中間体である *N*<sup>ε</sup>-acetylornithine の両方に対し、基質としてほぼ同程度の効率で脱アセチル化活性を示すことがわかった。

これらの結果、*T. thermophilus* HB27 株におけるリジン生合成はアルギニン生合成と進化的に共通の起源を有し、さらに現在においてもその機能を維持している可能性が示された [3, 4]

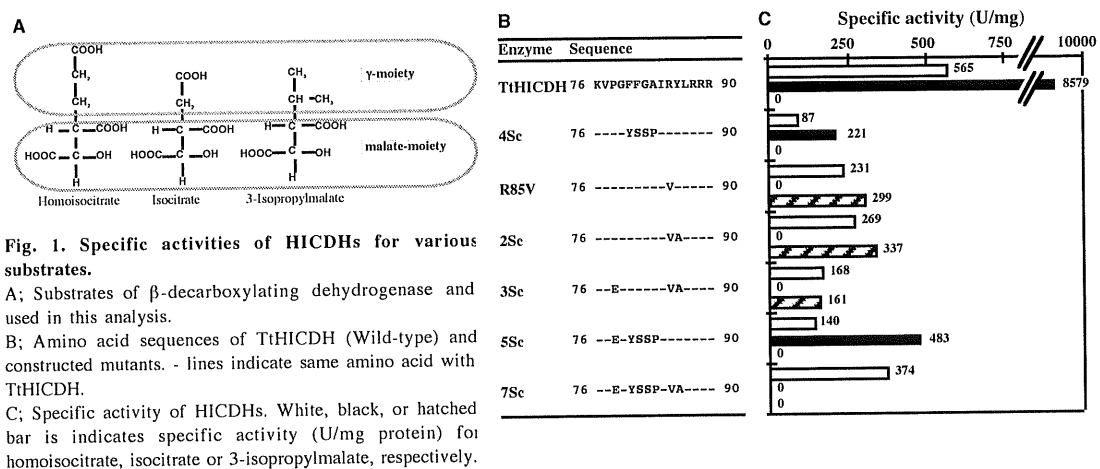
## II. Functional and structural analysis of homoisocitrate dehydrogenase in lysine biosynthesis and evolutionary implication of β-decarboxylating dehydrogenase

AAA を経由するリジン生合成において、homoisocitrate から 2-oxoadipate への変換は homoisocitrate dehydrogenase (HICDH) によって触媒される。AAA 合成までは同じ生合成経路を有する酵母やカビにおいても同じように HICDH の存在が推定されているが、全ゲノム配列が決定されている酵母でさえ本酵素をコードする遺伝子は同定されていない。したがって、この HICDH を同定することによって基質特異性及びその獲得に対する分子進化に関する知見がさらに得られることが期待できる。

HICDH は、類似代謝経路であるロイシン生合成の第3番目の酵素 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) 及び TCA cycle の isocitrate dehydrogenase (ICDH) と類似したアミノ酸配列及び立体構造をとるものと予想された。そこで、これら酵素との相同性を利用し、既にクローニングされている *T. thermophilus* HB8 株の IPMDH 及び ICDH とは明らかに異なるが、アミノ酸配列においてそれぞれ 44% 及び 45% の identity を有するタンパク質をコードする遺伝子のクローニングに成功した。本遺伝子がリジン生合成に関連するの否かを、ノックアウト変異株を作製し、その栄養要求性を調べることによって検証することとした。その結果、ノックアウト変異株は最少培地では生育しないものの、リジン、AAA、そして 2-oxoadipate のいずれかを最少培地に添加することによって生育の回復がみられた。このことから、クローン化した遺伝子がリジン生合成に必須であることがわかった。さらに本遺伝子を大腸菌において発現、精製し、遺伝子産物である酵素の活性を測定したところ、実際に homoisocitrate に対する脱炭酸脱水素活性が検出されたことから、クローン化した遺伝子がリジン生合成関連酵素 HICDH をコードする遺伝子であることが明らかとなった。しかしながら、本

酵素 (TtHICDH) の反応速度論的な解析を行ったところ、大変興味深いことに TtHICDH は本来の基質である homoisocitrate を基質とするよりも、ICDH の基質である isocitrate を基質として反応を行った場合に 20 倍も高い触媒効率を示すことが明らかになった。このことから、*T. thermophilus* HB27 株におけるリジン生合成はロイシン生合成及び TCA cycle の一部と進化的な共通の起源を有し、さらに TCA cycle の一部とは現在もなおその機能的関連がある可能性が示された。

一方、AAA までが同じ経路でリジンを生合成している出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HICDH (ScHICDH) を全ゲノム配列から推定し、大腸菌を用いて発現、精製し、その活性を調べたところ、ScHICDH は本来の基質である homoisocitrate のみを基質として認識することがわかった。この TtHICDH とは明らかに異なる基質認識機構の違いの原因を明らかにするために、TtHICDH に部位特異的変異を導入することによって基質認識に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。paralog である IPMDH 及び ICDH に関しては、三次元立体構造が既に決定されていることから、これらの情報をもとにして両 HICDH の基質認識に関わる残基を推定した。それぞれの酵素の基質である homoisocitrate、3-isopropylmalate、isocitrate の化学構造が全く同じ部分をもたれ malate-moiety、異なる部分を  $\gamma$ -moiety と呼ぶが (Fig. 1A)、酵素の malate-moiety を認識する残基に関しては完全に保存されている一方で、 $\gamma$ -moiety を認識する残基に関しては、これら 3 つの酵素の間で全く保存されていないことから HICDH においてもこの部分が基質認識に重要な部分と推定した。さらに、この部分に関しては TtHICDH と ScHICDH の間でもほとんどアミノ酸配列が類似していないことから、この部分の構造の違いが両者の基質認識機構の違いを決定しているものと考えられた。そこで、TtHICDH において、この部分を構成する 7 つのアミノ酸残基を ScHICDH のそれに置換することとした。その結果、7 つの残基全てを置換し、この部分に関しては完全に ScHICDH と同じ配列をもつ mutant である 7ScHICDH は homoisocitrate のみを基質として認識するようになり、同領域が HICDH の基質特異性を担っていることが明らかとなった (Fig. 1B, C)。また、R85V を含む mutant は、homoisocitrate に関しては大きく変化しなかったが、isocitrate に対する活性がなくなり、代わりに本来有していなかった IPMDH の基質 3-isopropylmalate に対する活性を示すようになった。このことから、TtHICDH の 85 番目のアルギニン残基は  $\beta$ -decarboxylating dehydrogenase の進化を方向付けている重要な残基である可能性が示唆された [5]。また、7ScHICDH を一つずつ TtHICDH の配列に戻していくことによって、homoisocitrate のみを認識するには R85V に加えて F80Y の mutation が必要であることも明らかにした。



HICDHの基質認識機構をさらに詳細に理解するために、TtHICDH及びその mutantのX線結晶構造解析を行った。現在のところ、TtHICDH及び7ScHICDHの結晶に関しては、それぞれ1.85Å、1.91Åの反射が得られ、このデータをもとに現在、モデルの精密化を行っている。TtHICDHの全体の構造は既に三次元立体構造が決定しているIPMDH及びICDHと非常に類似している (Fig. 2) [6]。これらの中で基質認識に関わる領域のアミノ酸残基を比較することで、 $\beta$ -decarboxylating dehydrogenaseの基質認識に関する新たな知見が得られるものと期待される。

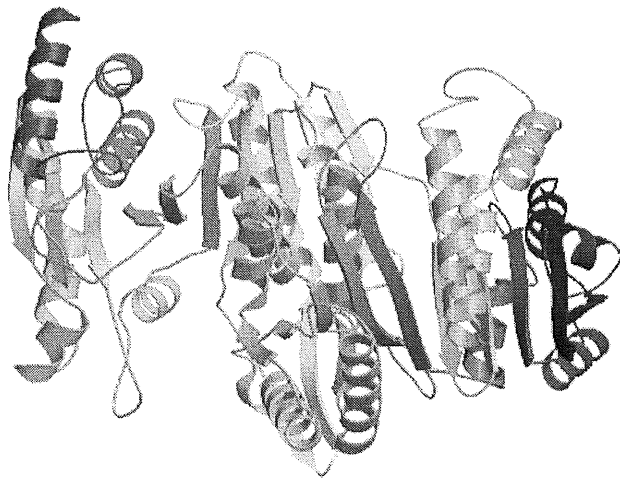


Fig. 2. Crystal structure of TtHICDH.

### III. Conclusions

本研究において、*T. thermophilus* HB27株のリジン生合成に関わる3つの酵素のクローニング及びその特性解析を行った。本菌におけるリジン生合成関連酵素は本来の役割であるリジンの生合成だけでなく、進化的に関連性のある代謝に対しても機能しているという大変興味深い結果が得られた。近年の全ゲノム解析から、本菌にみられるリジン生合成は真正細菌、古細菌、真核生物において幅広く分布していることがわかっている。このことは、本菌のリジン生合成が決して特殊な経路ではないことというを物語っている。本菌におけるリジン生合成をより詳細に解析することによって、基質特異性の獲得や初期生命に関する新たな知見が明らかになっていくと期待される。本研究により、これらの未だ未解決の問題を解明するための新たな道筋を指し示すことができたものと考えている。

### IV. References

- 1) Kobashi, N., *et al.* (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1713-1718.
- 2) Nishida, H., *et al.* (1999) *Genome Res.* **9**, 1175-1183.
- 3) Miyazaki, J., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 5067-5073.
- 4) Miyazaki, J., *et al.* (2002) *FEBS Lett.* **512**, 269-274.
- 5) Miyazaki J., *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 1864-1871.
- 6) Miyazaki J., *et al.* in preparation