

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏 名 吉田 彩子
指導教員名 西山 真

論文題目

リジン生合成に関わるアミノ酸キナーゼの制御および機能発現に関する
構造生物学的研究

リジンはヒトや家畜などの高等動物では自ら生合成できない必須アミノ酸の一つであり、近年の人口増加に伴う食肉需要の増大により、家畜飼料用のリジン生産量が年々増加している。リジンの工業的生産にはグルタミン酸発酵でも知られている *Corynebacterium glutamicum* が用いられている。*C. glutamicum* においてリジンはアスパラギン酸を初発物質としてジアミノピメリン酸(DAP)を経由する DAP 経路で生合成される。この経路の初発酵素であるアスパラギン酸キナーゼ(AK, aspartate kinase)はアスパラギン酸の β -カルボキシル基を ATP を用いてリン酸化する酵素であるが、最終産物であるリジンとスレオニンが共に存在するときのみ阻害を受ける(協奏阻害)ことで最終産物の生産量を調節している。リジン発酵系ではこの AK のフィードバック阻害耐性変異株が用いられており、AK はリジン発酵の鍵酵素であるにもかかわらず、この制御機構はリジン発酵系の確立から 50 年以上もの間謎のままであった。

一方、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は *C. glutamicum* とは異なり DAP ではなく α -アミノアジピン酸(AAA)を経由する新規 AAA 経路でリジンを生合成し、その AAA からリジンへの変換過程において LysW という AAA の α -アミノ基の保護基として働くタンパク質が関与することが示されている。さらに、酸性タンパク質である LysW は各生合成酵素と静電相互作用することでリジン生合成の効率を高めるキャリアタンパク質としての機能を持つことも示唆されている。*Thermus* は進化的に起源生物に近いバクテリアであるといわれており、*Thermus* におけるキャリアタンパク質 LysW の生合成酵素による認識機構を明らかにすることはアミノ酸生合成の進化を理解する上で重要であると考えられる。

そこで、これらの異なる 2 つのリジン生合成経路に存在するアミノ酸キナーゼである AK と LysZ に着目し、構造生物学を中心とした手法を用いて活性制御機構及び基質認識機構の解析を行った。

1. *C. glutamicum* 由来アスパラギン酸キナーゼのβサブユニットの結晶構造解析(2)

Lys と Thr によって阻害を受け、 $\alpha_2\beta_2$ ヘテロテトラマー構造を持つ CgAK の活性制御機構を明らかにするため、まずその活性制御を担うとされるβサブユニット(CgAKβ)について X 線結晶構造解析を行い、1.58 Å 分解能で結晶構造を決定することに成功した。CgAKβは Thr を結合したダイマー構造を取っていた(図 1)。この構造は $\alpha_2\beta_2$ 型の CgAK 全長におけるαサブユニットの C 末活性制御ドメインとβサブユニットのダイマー構造に相当する。AK の活性制御ドメインには ACT ドメインといわれるアロステリックな活性制御をうける酵素に保存されたエフェクター結合ドメインが 2 つ(それぞれ ACT1、ACT2)存在しているが、結晶構造では N 末側の ACT1 がもう一方のサブユニットの C 末側の ACT2 と相互作用してエフェクター(Thr)結合ユニットを形成して、ダイマーあたり 2 分子の

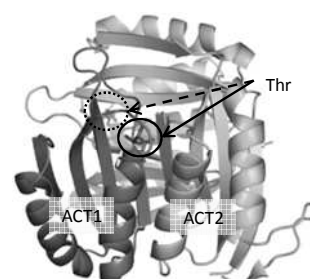


図1 CgAKβのダイマー構造

Thr を結合していた。Thr がサブユニット間に埋まるように結合しており、βサブユニットのダイマー化に寄与している可能性が考えられたため、CgAKβの Thr や Lys の結合による分子量の変化を解析した。その結果 CgAKβは Thr の結合によってモノマーからダイマーへと変換することが示され、さらに、Thr 耐性を与える変異を導入した CgAKβではこの Thr によるダイマー化が見られなかった。以上より、Thr による活性制御サブユニット(ドメイン)のダイマー化が活性制御に必須であることが示唆された。また、Lys アナログである S-2-aminoethyl L-cysteine (AEC) を用いたスクリーニングにより得られたフィードバック阻害耐性変異体(A30V、S52F、T59I)のうち、S52F以外の変異体は実際には Thr 耐性であることが分子量解析などから示され、これらの結果からも Thr 結合による活性制御ドメインのダイマー化が一段階目として起こることが活性制御に必須な段階であることが支持された。

2. *C. glutamicum* 由来アスパラギン酸キナーゼの活性制御機構の解析(4)

活性制御ドメインの構造では明らかにならなかった Lys 結合部位や阻害剤結合による構造変化を明らかにするため $\alpha_2\beta_2$ 全長での CgAK の結晶構造解析を行った。その結果 Lys・Thr の結合した阻害型(CgAK-T)、Thr のみの結合した活性型(CgAK-R*)、さらに、フィードバック阻害耐性変異体の Lys・Thr の結合した構造(CgAK-S301F)を決定することに成功した(図 2)。これらの構造比較から、CgAK の活性制御機構は、①Thr による活性制御ドメイン(サブユニット)のダイマ

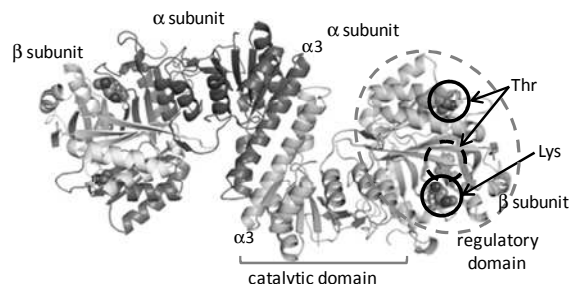


図2 CgAKの阻害型構造

一化と②Lys 結合による閉じた阻害型構造の安定化の二段階からなることが分かった(図3)。二段階目の制御について以下にその概略を述べる。リジンがエフェクター結合部位に結合することにより β サブユニットと触媒ドメインとの間に新たな相互作用が形成され、閉じた阻害型構造が安定化される。この動きに伴って基質の Asp 結合残基である Glu74 と Arg151 が強固なイオン結合を形成するように側鎖構造を変化させ、閉じた構造の安定化に寄与すると同時に、Asp 結合を阻害する。またこの構造では Asp の代わりに基質結合部位に Lys が結合可能となり、阻害型構造がより安定化される。このように CgAK-T 及び CgAK-R*の構造比較などから CgAK における複雑な協奏阻害機構が明らかとなった。

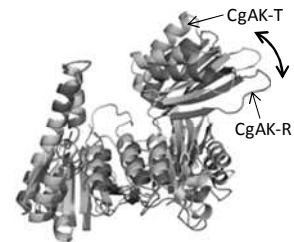


図3 CgAK-TとR*の重ね合わせ

一方、CgAK-S301Fの結晶構造の非対称単位に含まれる8つの α サブユニットの構造は様々であり、Lys・Thrを結合しているにもかかわらず、CgAK-R*のような開いた構造やCgAK-Tと同様の閉じた構造、さらにはより閉じた構造というように様々な構造をとっていた。このことからCgAK-S301Fでは、変異によって阻害型の閉じた構造の安定性が低下し、その結果としてフィードバック阻害耐性となっていることが示唆された。

3. *T. thermophilus* 由来アスパラギン酸キナーゼの活性制御機構及び熱安定性の解析(1,3)

*T. thermophilus*も Thr によってフィードバック阻害を受ける $\alpha_2\beta_2$ 型の AK (TtAK)を持つ。*T. thermophilus* は高度好熱菌であり、そのタンパク質も高い熱安定性を持つことが知られている。そこで、TtAKの Thrによる制御機構や耐熱化機構を明らかにするため TtAKの β サブユニット(TtAK β)の結晶構造解析を行った。その結果、Thrが結合した TtAK β -Thr と結合していない TtAK β -free の構造を決定することに成功した。これらの構造比較やオリゴマー状態の解析から TtAK β が CgAK の場合と同様に Thr の結合に伴いダイマーが安定化され、そして Thr の結合により Thr 結合部位を覆うように存在する loop をはじめとした構造変化が誘起されることが分かった。

一方、安定性解析により TtAK β は CgAK β よりも約 40 °C 高い変性温度を持つことが分かった。TtAK β -Thr と同じく Thr を結合している CgAK β の結晶構造を比較することで、この TtAK β の高い熱安定性は、タンパク質内部の疎水性の増大とそれら疎水性残基の強固なパッキング(図4)、そして Pro 残基による loop の可動性の低下に起因することを示した。

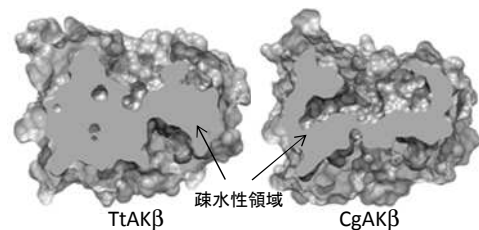


図4 TtAK β 及びCgAK β の断面の疎水性残基

4. *T. thermophilus* のリジン合成酵素 LysZ とキャリアタンパク質 LysW の機能構造解析(5)

T. thermophilus の新規リジン合成経路後半の AAA から Lys への変換過程において AAA の保護基として働くキャリアタンパク質 LysW の性質を明らかにするため、AAA から Lys への変換過程の第二番目の酵素であり、AK と同じくリン酸化反応を触媒する LysZ と、その

基質である LysW- γ -AAA の結晶構造解析を行った。まず LysW- γ -AAA の結晶構造を 1.20 Å 分解能で決定した(図 5)。LysW の C 末の Glu54 の γ -カルボキシル基と AAA の α -アミノ基がアミド結合しており、これまで生化学的に示されていた AAA から Lys への変換過程の第一番目の酵素である LysX による LysW の C 末への AAA の付加反応を結晶構造から実証することができた。さらに、LysZ/LysW- γ -AAA 複合体の構造を 1.85 Å 分解能で決定することに成功し(図 6)、2 つのタンパク質が静電相互作用によって結合していることを示した。この結晶構造では LysZ 1 サブユニット当たり 2 か所(①strand β 8 付近②活性中心付近)の LysW との相互作用部位が観察された。どちらも、LysW- γ -AAA の C 末を活性中心に結合していなかったため、LysZ の機能発現にどちらの相互作用が重要であるか結晶構造からだけでは分からなかった。このうち①の strand β 8 を含む 4 つの β strand で構成される領域が LysZ のアルギニン生合成系中でのホモログである ArgB との配列アラインメントにおいて違いが見られる部分であることや、相互作用部位の接触表面積が①の方が広いことから、①の相互作用が重要であることが示唆された。変異体を用いての活性測定や相互作用解析の結果、①が LysW- γ -AAA を基質として認識する部位であることが示された。

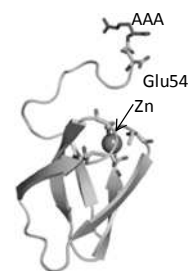


図5 LysW- γ -AAAの構造

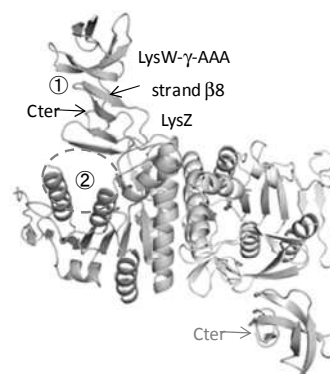


図6 LysZ/LysW- γ -AAA複合体構造

5. まとめ

本研究では2つの異なるリジン生合成系におけるアミノ酸キナーゼの活性制御機構や基質認識機構を明らかにした。AK の解析によって得られた成果を応用することで、新たなフィードバック阻害耐性変異体の創製や熱安定化により効率的にリジンを生産する発酵系の構築が可能となると考えられる。また *T. thermophilus* のリジン生合成系に関しては、LysZ 以外の生合成酵素とのキャリアタンパク質 LysW の相互作用解析を進め、新規リジン生合成系の全体像を明らかにすることが、アミノ酸生合成の進化の理解につながると考えられる。

参考文献

- 1) Yoshida A., Tomita T., Kuzuyama T., and Nishiyama M. (2007) *Acta Crystallogr F* **63**, 96-8
- 2) Yoshida A., Tomita T., Kurihara T., Fushinobu S., Kuzuyama T., and Nishiyama M. (2007) *J Mol Biol* **368**, 521-36
- 3) Yoshida A., Tomita T., Kono H., Fushinobu S., Kuzuyama T., and Nishiyama M. (2009) *FEBS J* **276**, 3124-36
- 4) Yoshida A., Tomita T., Kuzuyama T., and Nishiyama M. (2010) *J Biol Chem* **285**, 27477-86
- 5) Yoshida A., Tomita T., Kuzuyama T., and Nishiyama M. *manuscript in preparation*