

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成21年度 博士課程 入学
氏名 千葉 洋子
指導教員名 五十嵐 泰夫

論文題目

Glycine-related metabolism of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
(*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のグリシン関連代謝)

序章

本研究は、初期の生命はどのような代謝系を有していたのかという興味を発端とし、絶対独立栄養性水素細菌のグリシンを中心とした代謝系の解明を目指すものである。グリシン代謝系は生物にとって根源的かつ不可欠な生体成分であるアミノ酸および核酸の生合成に必須である。しかし、本代謝系はこれまで大腸菌や酵母など進化系統的に比較的最近派生した生物を中心に研究されており、初期の生命の特徴を残していると期待される「系統樹上で分岐が早い生物」での知見は極めて少ない。そのため、本代謝系の多様性やそれらの進化的関係についてはブラックボックスとなっている。

Hydrogenobacter thermophilus はバクテリアにおいて最も早くに分岐したと言われている *Aquificales* に属する絶対独立栄養性好熱性水素細菌である。これまでに本菌の炭酸および窒素同化代謝に関して詳細な研究がなされており、その結果特徴的な CO₂ 固定経路である還元的 TCA 回路をはじめとして、進化的に古い可能性が示唆される数多くの新規酵素・反応系が発見された。さらに近年本菌の全ゲノム解析が終了し、遺伝子情報からの代謝系予測が可能となった。したがって、代謝系を明らかにする上

で強力なツールとなるオミックス情報および生理生化学的知見が利用可能で、初期の生命に類似かつ新規な酵素・代謝系を有している可能性が非常に高い *H. thermophilus* のグリシン代謝系を解明することは、初期の本代謝について考察する上で極めて有効かつ興味深いと期待される。

第 1 章 グリシン代謝系の俯瞰

一般に、グリシンはグリオキシル酸、セリンまたはスレオニンから生合成されることが知られている。本菌はグリオキシル酸からグリシンを不可逆的に生成する aminotransferase (AT) を有することが知られていたが、残りの 2 反応の有無は不明であった。そこで、これらの反応経路の有無をゲノム情報および無細胞抽出液を用いた生化学的試験により確認した。結果、本菌はセリンからグリシンを生成する serine hydroxymethyltransferase (SHMT) 遺伝子を有し、実際に可逆的な SHMT 活性を有した。一方、スレオニンからグリシンを生成する threonine aldolase (TA) 遺伝子を欠いていたにもかかわらず、微弱ながらグリシン生成方向の TA 活性を有した。したがって、本菌は 3 種類の経路でグリシンを生成可能であり、主にはグリオキシル酸またはセリンを経由することが示唆された。しかし CO_2 からグリオキシル酸およびセリンを生成する経路をゲノム情報から予測することはできず、これら生合成経路には新規経路または酵素が存在する可能性が示唆された。なお、グリオキシル酸生合成経路の候補となる酵素活性の検出を試みたが、そのような活性は得られなかった。

第 2 章 Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) —主反応と副反応

第 1 節 SHMT からの TA 活性の検出

SHMT は主反応であるグリシン - セリン間の変換活性 (SHMT 活性) に加えて、スレオニンに対してアルドラーゼ活性 (TA 活性) を有することが知られている。ただし SHMT の TA 活性は SHMT 活性と比べてごく微弱 (大腸菌では k_{cat}/K_m 値がグリシン生成方向の SHMT 活性の 5×10^{-5}) で、生理学的意義はないとされてきた。一方、既知の TA 遺伝子を欠く本菌には SHMT 活性よりは低いものの検出可能なレベルの TA 活性が存在したことから、本菌の SHMT は既知のそれよりも高い TA 活性を有するのではないかと推察した。そこで、本菌の SHMT の SHMT および TA 活性の強度を検討した。その結果、本 SHMT は既知の SHMT と同レベルの SHMT 活性を有し、セリン生成方向よりもグリシン生成方向の反応を好むことが明らかになった。加えて、本 SHMT は SHMT 活性には劣るものの (k_{cat}/K_m 値が 4×10^{-3})、既知のそれより 150 倍以上高い TA 活性を示し、「本物の」TA のそれに匹敵した。本菌において SHMT の主反応はセリンからのグリシン生成反応であるが、スレオニ

ンからグリシンを生成する TA 活性も無視できない可能性が考えられた。また、この副反応である TA 活性は反応温度の上昇と共に相対的に上昇するため、本菌以外でも好熱菌では SHMT が普遍的に高い TA 活性を示す可能性が示唆された。

第 2 節 SHMT の aldolase 活性の反応機構

SHMT はスレオニン以外にも様々な β -hydroxyamino acid に対してアルドラーゼ活性を有することが知られている。しかし、本反応機構および基質選択性（すなわち、なぜ *erythro* 体よりも *threo* 体を好み、 $C\beta$ にメチル基が付いているものよりフェニル基が付いているものに対する活性が高いのか）が何に起因するかは不明であった。そこで、量子力学計算と生化学的実験の融合により、これらの疑問の解明を試みた。量子力学計算から、本アルドール反応は水由来の OH が基質の β -OH 基を求核攻撃することにより起こり、 $C\alpha$ - $C\beta$ の解裂が律速段階であることが強く示唆された。また、量子力学計算から求めた種々の基質に対する活性化エネルギーとアレニウスプロットから求めた活性化エネルギーおよびアレニウス定数を比較することにより、本基質選択性は水素結合による遷移状態の安定化と、 $C\beta$ の官能基による負電荷の非局在化の度合いの違いに起因すると考えられた。

第 3 章 新規 metal-independent phosphoserine phosphatase (iPSP)

第 1 節 iPSP の精製と性状解析

本菌のゲノムにはホスホセリンの脱リン酸化によりセリンを生成する phosphoserine phosphatase (PSP) の遺伝子が存在しないため、本菌のセリン生合成経路は不明であった。しかしメタボローム解析によりホスホセリンの存在を確認でき、その生合成経路もゲノム情報から予測可能であったため、本菌には既知のものとは進化的に異なる PSP が存在するのではないかと予測し、その探索を行った。

本菌の無細胞抽出液から PSP 活性を検出した。既知の PSP 活性が Mg^{2+} 依存적であるのに対し、本活性は金属非依存的であった。そこで本 PSP 活性を有するタンパク質を精製したところ 2 種類得られた。ひとつは HTH0103 にコードされているタンパク質(PspA)のホモ 2 量体であり、もうひとつは PspA と HTH0183 にコードされているタンパク質(PspB)のヘテロ 2 量体であった。驚くべきことに HTH0103 と HTH0183 は解糖/糖新生系の酵素である phosphoglycerate mutase (PGM) と近縁であり、既知の PSP とは進化的に全く異なるものであった。また、PGM 活性は示さなかった。そこで本ホモ、ヘテロタンパク質をそれぞれ metal-independent PSP (iPSP) 1, 2 と命名した。無細胞抽出液中での活性の強度、基質選択性、動力学的パラメーターなどから、本タンパク質は *in vivo* で実際に PSP として機能しているこ

とが強く示唆された。また、iPSPは *Aquificae* だけでなく、既知の PSP ホモログを欠く他の生物 (*Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, 一部の *Firmicutes* など) にも存在する可能性が示唆された。

第2節 iPSPの構造学的性状解析

1節の研究で、PspAのホモログであるPspBはPSP活性を有さないことが示唆された。この理由を探るため、iPSP1およびiPSP2を結晶化し、X線結晶構造解析を試みた。iPSP1の構造は1.5Åの分解能で決定できたが、iPSP2については十分な分解能を示す結晶が得られなかったため、iPSP1の構造を基にPspBサブユニットの構造をモデリングした。PspAおよびPspBの構造を比較したところ、活性中心への入り口の大きさが両者で大きく異なり、PspAでは小さいのに対しPspBでは非常に大きく活性中心が溶液に対してむき出しになっていることが示唆された。そのためPspBサブユニットは基質を安定的に保持できず、PSP活性を示さないのではないかと考えられた。

総括

以下の図に示すように、*H. thermophilus*はATおよびSHMTの触媒活性により3経路でグリシンを生成しうる。また、本菌は新規なiPSPを用いてセリンを生成可能である。現在のところグリオキシル酸合成経路は不明であり、この経路にも新規な反応もしくは酵素が存在する可能性が強く示唆される。

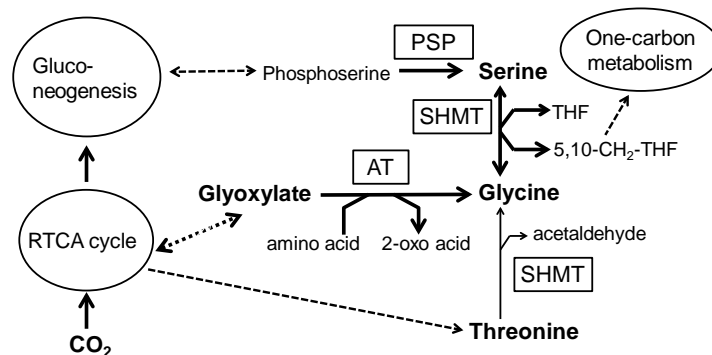


Fig. *H. thermophilus* TK-6 のグリシン生合成経路

生化学的に活性を確認済みの反応を実線、ゲノム情報から存在が予想される経路を破線で示した。

発表論文

Chiba, Y., Terada, T., Kameya, M., Shimizu, K., Arai, H., Ishii, M., Igarashi, Y. (2012)

“Mechanism for folate-independent aldolase reaction catalyzed by serine hydroxymethyltransferase” FEBS Journal (印刷中)