

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0153

研究課題名（和文）アミノ酸代謝の恒常性に関する新奇ビタミンB6タンパク質の機能解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of a conserved pyridoxal phosphate-binding protein involved in the homeostasis of amino acid metabolism

研究代表者

伊藤 智和（Ito, Tomokazu）

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：90584970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ピリドキサルリン酸（PLP）結合タンパク質であるYggS/PROSCタンパク質の欠損・変異は、アミノ酸やビタミンB6代謝を中心とした多岐にわたる代謝系を攪乱する。本研究は、本タンパク質が、様々な生物においてビタミンB6、特にピリドキシリン酸（PNP）、の恒常性制御に重要な役割を果たすことを明らかとした。また、大腸菌では、この欠損が誘導するPNPの異常蓄積が、グリシン開裂系の機能不全を経てアミノ酸代謝を含む多様な代謝系を攪乱することを明らかとした。本タンパク質の分子機能として、PLPおよびピリドキサミンリン酸（PMP）間の変換過程に関する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、多くの生物におけるビタミンB6・アミノ酸代謝ホメオスタシスの鍵因子であるYggS/Proscタンパク質の生理機能の解析に取り組んだ。ヒトを含め、多くの生物で認められる当該タンパク質の欠損により引き起こされる多岐にわたる影響が、補酵素機能を有さないピリドキシリン酸の異常蓄積に起因する可能性を提示し、また、当該タンパク質がピリドキサルリン酸・ピリドキサミンリン酸間のサイクリング反応に関与する可能性が示された。また、ピリドキサルリン酸・ピリドキシリン酸の変換を触媒するピリドキサルレダクターゼが、現在考えられている以上に保存されたビタミンB6代謝経路である可能性も示された。

研究成果の概要（英文）：Loss or mutation of YggS/PROSC protein, a pyridoxal phosphate (PLP)-binding protein, disrupts a wide variety of metabolic systems, especially amino acid and vitamin B6 metabolism. This study has demonstrated that the YggS/PROSC protein plays an important role in the homeostasis of vitamin B6, especially pyridoxine phosphate (PNP), in various organisms. In *E. coli*, the abnormal accumulation of PNP inhibits the glycine cleavage system and various metabolic pathways, including amino acid metabolism. The present study suggests that the YggS/PROSC protein may be involved in the conversion process between PLP and pyridoxamine phosphate (PMP).

研究分野：応用生物化学

キーワード：ビタミンB6 ピリドキサルリン酸 ピリドキシリン酸 YggS/PROSC PLPBP

1. 研究開始当初の背景

我々は、バクテリアからヒトにいたる生物に高度に保存され、D-アミノ酸代謝酵素と相同性を有する機能未知ピリドキサルリン酸(PLP)結合タンパク質「YggS/Prosc タンパク質(PLPBP)」の機能解析の過程で、大腸菌を用いて、当該タンパク質(YggS)が様々なアミノ酸代謝の恒常性維持に重要な役割を果たすことや、この機能が、バクテリアからヒトに至る様々な生物において保存されることを見出していた。海外共同研究者らは、サルモネラ菌において当該タンパク質(YggS)が大腸菌とは異なるフェノタイプを示すことを見出していた。また、ヒトにおける当該タンパク質の変異が、ビタミン B6 依存性てんかんの発症原因であることが報告されていた(Darin et al. Am J Hum Genet. 2016)。当時、断片的に報告される当該タンパク質に機能性に関する知見は(図 1 参照)、いずれも、当該タンパク質が、様々な生物におけるアミノ酸代謝—ビタミン B6 代謝の恒常性維持に極めて重要な役割を果たす新規因子である可能性を示唆していたが、その詳細は分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、YggS/Prosc ファミリータンパク質の生理機能を、特に大腸菌・サルモネラ菌を用いた遺伝生化学、メタボロミクス、システムバイオロジー融合手法を用いた機能解析によって同定し、ほぼ未知のまま残されるビタミン B6—アミノ酸ホメオスタシスの分子基盤の解明を目的とした。

3. 研究の方法

大腸菌およびサルモネラ菌を用いたメタボロミクスと、システムバイオロジーの融合手法により、yggS 欠損株での代謝経路の変遷を視覚化し、この情報を基にした遺伝生化学により、この機能を同定することを目指した。なお、この際には、既報のピリドキシン依存性てんかんの主因として、PLP と高反応性を示すγ-アミノアジピン酸セミアルデヒド(α-AAS)の蓄積が知られること、yggS がある種細菌ゲノムでグルタミン酸セミアルデヒド(GSA)生成酵素の近傍に存在していること、Ile 生合成の中間体として生じるα-アミノクロトン酸(α-CA)が PLP 酵素と高反応性を示すこと、などを念頭に、YggS/Prosc ファミリータンパク質が、アルデヒド含有アミノ酸やα-CA など、PLP や PLP 酵素と高反応性を示す化合物の異化(消去)に関与している可能性を考慮した。また、YggS/Prosc ファミリータンパク質の構造情報から、これが新規 PLP ストア・キャリアーとしての可能性も検証した。

4. 研究成果

我々は大腸菌 yggS 欠損株を用いた解析から、当該タンパク質の欠損が、特に Thr/Ile/Val 代謝に顕著な影響を及ぼすことを見出していたが(Ito et al. J Bac. 2013; Ito et al. JBB. 2016)、その分子基盤は明らかではなかった。また、別の研究は、この欠損株が野生株でほとんど認められないピリドキシンリン酸(PNP)を蓄積することや、この脱リン酸体であるピリドキシン(PN)に対して感受性を示すことなどを報告していた(Prunetti et al. Microbiology. 2016)。

我々は、当該タンパク質が Thr/Ile/Val 代謝に与える影響を詳細に解析するなかで、この欠損株が Thr 合成系の前駆体である Homoserine に対して高感受性を示すことを見出した。さらに、Homoserine 処理が、Thr/Ile/Val 代謝を亢進すること、この代謝経路のブロックが、この代謝亢進や細胞毒性、さらには、アミノ酸プールの変動を消失させることを明らかとした。Homoserine における Thr/Val/Ile 代謝亢進と細胞内におけるビタミン B6 プールの関連性を調査したところ、両者に関連性を見出した。yggS 欠損株では、PNP の異常蓄積が認められるが、この PNP レベルが Homoserine によって増加していた。また、PN 存在下で培養した yggS 欠損株が高濃度の Val を菌体内に蓄積することを見出し、PNP レベルと菌体内 Val レベルの相関を見出した。大腸菌では、PNP の蓄積が Thr/Ile/Val 代謝の亢進の要因であることが明らかとなった。アミノ酸、ビタミン B6 プールのメタボロームを子細に解析することで、両者のクロストークの存在が明らかとなった。(Conserved Pyridoxal 5'-Phosphate-Binding Protein YggS Impacts Amino Acid Metabolism through Pyridoxine 5'-Phosphate in Escherichia coli. Ito T, Yamamoto K, Hori R, Yamauchi A, Downs DM, Hemmi H, Yoshimura T. Appl Environ Microbiol. 2019 May 16;85(11):e00430-19.)

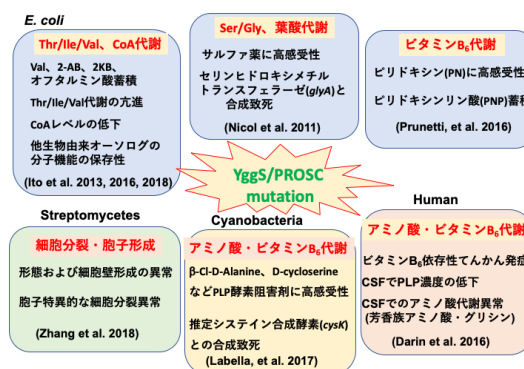


図 1 YggS/Prosc タンパク質欠損がもたらす多様なフェノタイプ

大腸菌において、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (GlyA) と YggS の二重欠損株は LB 培地上において合成致死性を示すことが報告されていたが(Nicols et al. Cell. 2011)、この要因は明らかではなかった。上記の研究成果から、この要因もまた、PNP の蓄積によるものと予想した。 *glyA yggS* 二重欠損株の作製を試みたところ、同株は作製可能であり、LB 培地上で、顕著な生育阻害を示すことが明らかとなった。 PNP→PLP の反応を触媒する PNP オキシダーゼの発現や、イノシンや、グアノシンの添加が、同二重欠損株の生育阻害を顕著に回復することを見出し、PNP 依存性のプリンヌクレオシド生合成過程への影響が、この致死性の要因であろうことが予想された。 GlyA は Ser および Gly、テトラヒドロ葉酸および 5, 10 メチレンテトラヒドロ葉酸 (5, 10mTHF) の相互変換を触媒する PLP 依存酵素であり、大腸菌における主要な C1 ユニットの供給を担う。 GlyA 非存在下における 5, 10mTHF の供給は、同じく PLP 依存性酵素複合体であるグリシン開裂系 (GCV) が担っている。 PNP が GCV 活性を阻害することを、in vivo および in vitro の解析によって明らかとした。 本研究では、PNP 依存性の PLP 酵素の阻害が、当該タンパク質の欠損で認められる多岐に亘るフェノタイプの要因である可能性を提示した。

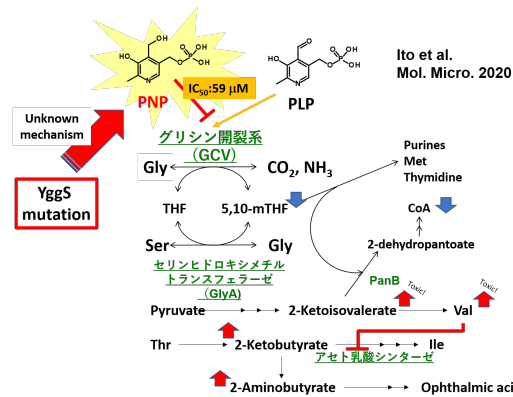


図2 大腸菌 *yggS* 欠損株で報告されたフェノタイプ具現化の分子基盤

(Inhibition of glycine cleavage system by pyridoxine 5'-phosphate causes synthetic lethality in *glyA yggS* and *serA yggS* in *Escherichia coli*. Ito T, Hori R, Hemmi H, Downs DM, Yoshimura T. Mol Microbiol. 2020 Jan;113(1):270-284.)

サルモネラ菌における *yggS* 欠損株は、大腸菌における同遺伝子の欠損株とは必ずしも同一のフェノタイプを示さない。両近縁な微生物におけるフェノタイプの同一性および差異に着目し、YggS タンパク質の分子機能の同定を試みた。例えば、大腸菌で認められた The/Ile/Val 代謝系の攪乱や Homoserine 感受性、GlyA との合成致死性はサルモネラ菌の欠損株では認められない。一方で、PNP の蓄積は両生物において共通のフェノタイプであった。また、両生物における新たな共通のフェノタイプとして、当該欠損株の欠損が、PLP の細胞外への排出を誘導することを見出した。本タンパク質のフェノタイプにおいてビタミン B6 プールの摂動がより上流に位置するとの考えのもと、その合成・代謝 (サルベージ) 経路に着目して更なる研究を行った。サルモネラ菌における de novo 合成系をシャットアウトし、ここに別経路によって (酵母由来 PLP 合成酵素) PLP を供給するヘテロガスな人工経路を有する菌株を作製するとともに、ビタミン B6 代謝経路に様々な変異を導入し、当該タンパク質がどのようにビタミン B6 ホメオスタシスに影響を及ぼすのかを詳細に解析した。その結果、大腸菌やサルモネラ菌において認められた PNP の蓄積は、この合成や代謝系への直接的な影響の結果ではないものとの結論を得た。また、当該タンパク質が、PLP-ピリドキサミンリン酸 (PMP) 間のサイクリングに関与する可能性が見出された (図 3)。(The Role of YggS in Vitamin B6 Homeostasis in *Salmonella enterica* Is Informed by Heterologous Expression of Yeast SNZ3. Vu HN, Ito T, Downs DM. J Bacteriol. 2020 Oct 22;202(22):e00383-20.)

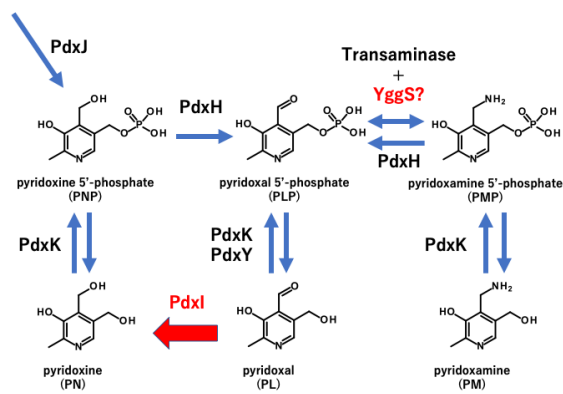


図3 明らかとなった大腸菌の新たなビタミン B6 代謝経路

上記の一連の研究において、大腸菌における *yggS* 遺伝子の欠損に加え、既知のビタミン B6 代謝酵素の多重変異株を網羅的に作製していた。これら大腸菌株におけるビタミン B6 動態、生育特性を仔細に解析すると、既知のビタミン B6 代謝酵素の知見によっては説明できない現象が見出された。すなわち、大腸菌では PLP がその前駆体として PNP を経由する DXP 依存経路によって供給されるが、大腸菌の PNP 合成酵素である *pdxJ* 欠損株と、それに続く PNP→PLP の反応を触媒する *pdxH* 欠損株が異なるビタミン B6 要求性を示し、*pdxH* 欠損株では *pdxJ* 欠損株と比較し、10 倍以上の外因性の B6 ビタマー (ピリドキサル, PL) を要求することが見出された (図 3)。

この現象を詳細に解析したところ、大腸菌が培養中に外因性の PL を極めて効率的に PN(ピリドキシン)へと変換することが明らかとなり、この変換活性が、上記の現象を引き起こしていることが明らかとなった。そして PL→PN への変換を媒介する責任酵素として YdbC(PL レダクターゼ, pdxI)を同定した(図 3)。本研究成果は、大腸菌が、ビタミン B6 の代謝経路として PL レダクターゼを有することを明らかとし、また、この系統解析は、PL レダクターゼが、現在考えられている以上に様々な生物に存在する可能性を強く示唆した。

(Pyridoxal Reductase, PdxI, Is Critical for Salvage of Pyridoxal in Escherichia coli. Ito T, Downs DM. J Bacteriol. 2020 May 27;202(12):e00056-20.)

上記解析は、本タンパク質ファミリーが大腸菌や、サルモネラにおいてビタミン B6 プールのホメオスタシスに重要な役割を果たすことを明らかとした。並行して行った酵母や枯草菌における当該タンパク質欠損株の解析、また、網羅的なビタミン B6 代謝酵素の多重欠損株の解析は、当該タンパク質の欠損が、様々な生物において PNP の蓄積を誘導することを明らかとした。さらに、この PNP の異常蓄積が、PLP 酵素の(部分的な)機能不全を引き起こすことで、多様な代謝系が影響を受ける可能性が明らかとなってきた。本タンパク質がどのように PNP レベルの維持に関与しているのかは未だ明らかではないが、ごく最近の我々の解析結果は、これが効率的な PLP →PMP 変換のために重要な役割を果たす可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Tomokazu, Downs Diana M.	4. 巻 202
2. 論文標題 Pyridoxal reductase, PdxI, is critical for salvage of pyridoxal in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00056-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00056-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Tomokazu, Hori Ran, Hemmi Hisashi, Downs Diana M., Yoshimura Tohru	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of glycine cleavage system by pyridoxine 5 phosphate causes synthetic lethality in glyA yggS and serA yggS in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 270 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Tomokazu, Yamamoto Kana, Hori Ran, Yamauchi Ayako, Downs Diana M., Hemmi Hisashi, Yoshimura Tohru	4. 巻 85
2. 論文標題 Conserved Pyridoxal 5'-Phosphate-Binding Protein YggS Impacts Amino Acid Metabolism through Pyridoxine 5'-Phosphate in Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00430-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00430-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito T, Yamamoto K, Hori R, Yamauchi A, Downs DM, Hemmi H, Yoshimura T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Conserved Pyridoxal 5'-Phosphate Binding Protein YggS Impacts Amino Acid Metabolism through Pyridoxine 5'-Phosphate in Escherichia coli.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00430-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小河ほのか、伊藤智和、邊見久、吉村 徹
2. 発表標題 YggS/PROSCタンパク質ファミリーによるビタミンB6恒常性維持機構
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本佳奈、伊藤智和、邊見久、吉村徹
2. 発表標題 YggS/PROSCファミリータンパク質のアミノ酸代謝制御機構の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤智和
2. 発表標題 アミノ酸・ビタミン B6 恒常性に関する新奇ビ タミン B6 結合タンパク質
3. 学会等名 日本ビタミン学会第 7 2 回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤智和
2. 発表標題 高度に保存されたビタミン B6 結合タンパク 質の機能解析と応用展開
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021 年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小河ほのか, 伊藤智和, 邊見久, 吉村徹
2. 発表標題 YggS/PROSC タンパク質ファミリーによるビタミン B6 の恒常性維持機構
3. 学会等名 日本ビタミン学会第 72 回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山 尚来, 伊藤 智和, 邊見 久, 吉村 徹
2. 発表標題 哺乳類のPLレダクターゼ同定に向けた取り組み
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021 年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤智和
2. 発表標題 高度に保存されたビタミン B6 結合タンパク 質の機能解析と応用展開
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部 第189回支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山 尚来, 伊藤 智和, 邊見 久, 吉村 徹
2. 発表標題 哺乳類のPLレダクターゼ同定に向けた取り組み
3. 学会等名 第85回 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ダイアナ ダウンズ (Downs Diana)	ジョージア大学・Department of Microbiology・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
アメリカ合衆国	University of Georgia			
アメリカ合衆国	University of Georgia			