

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06001・19K21144

研究課題名（和文）酵母のBCAAアミノ基転移酵素の細胞内局在性とBCAA生合成機構に関する研究

研究課題名（英文）Studies of branched-chain amino acid aminotransferase and BCAA metabolism on *S. cerevisiae*

研究代表者

豊川 洋一（Toyokawa, Yoichi）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・博士研究員

研究者番号：80818683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：酵母におけるBCAA生合成系において重要な役割を持つBat1に対し、A234Dのアミノ酸置換を導入することで、生育速度や細胞内バリン含量が低下することを明らかにした。さらに、Bat1へのA234DおよびA296Tのアミノ酸置換の導入により、培養液中のフーゼルアルコール含量が増加することが明らかとなった。各変異型Bat1は細胞内で野生型Bat1と同程度の発現量を示したことから、A234Dのアミノ酸置換によりBat1の機能不全が引き起こされると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果を通して、Bat1の構造と生理的機能の関わりについて、さらに理解を深めることができた。また、イソブタノールは次世代バイオ燃料として注目されており、酵母を利用したイソブタノール高生産に関する研究がこれまでに多数報告されている。本研究課題ではBAT1へ変異を導入することにより、その生産性が向上することを始めて明らかにできたことから、酵母の応用的利用への波及も期待される。

研究成果の概要（英文）：Introduction of A234D amino acid substitution to Bat1, that plays an important role on BCAA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, led significant decreases in growth rate and intracellular valine content. Moreover, yeast cell expressing Bat1 variants, introduced A234D or A296T, showed an increase in the productivity of fusel alcohols, respectively. These results indicate that the amino acid change from Ala to Asp at position 234 led to a functional impairment of Bat1.

研究分野：応用微生物学

キーワード： *Saccharomyces cerevisiae* 分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 分岐鎖アミノ酸 BCAT BCAA バリン
フーゼルアルコール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの筋肉の主要構成アミノ酸であり、代表的な必須アミノ酸である分岐鎖アミノ酸 (BCAA; バリン、イソロイシン、ロイシン) は、健康機能 (筋肉強化、肝機能向上、疲労回復など) を有する機能性アミノ酸として知られ、医薬品やサプリメントに利用されているほか、食品の付加価値を高める機能性成分としても注目されている。BCAA は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、ミトコンドリア内で一部重複した生合成経路を経て生成される。特に、バリンとイソロイシンはその生合成の最終段階で、前駆物質が同一酵素群による反応プロセスを経て、最終的に BCAA アミノ基転移酵素 (BCAT) による可逆的なアミノ基転移反応を受けて生成される。酵母の細胞内には Bat1 と Bat2 の 2 種類の BCAT が存在し、Bat1 はミトコンドリア内、Bat2 は細胞質内にそれぞれ局在しており、パラログとして、酵母細胞内での BCAA の生合成や分解などの代謝にそれぞれ寄与していると考えられていた (A. Eden *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1996)。しかし近年、Bat1 は BCAA の同化に、Bat2 は BCAA の異化に強く関与していることが報告された (M. Colon *et al.*, *Plos One*, 2011)。また最近、研究代表者の所属研究室において、BCAT が細胞質ではなくミトコンドリアに局在することが細胞内の効率的なバリン合成に必要であることが示された (N. Takpho *et al.*, *Microb. Cell*, 2018)。さらに、Bat1 の欠損によりバリン合成能が低下したのに対し、ロイシンやイソロイシンの合成能には変化が見られなかったとも報告している (N. Takpho *et al.*, *Microb. Cell*, 2018)。これらの知見は、酵母における BCAA の生合成過程において、BCAT が重要な役割を果たしているものの、BCAT の細胞内局在性が異なっている生理的意義を十分に説明できるものではなく、BCAA の代謝制御機構や生理機能に未解明な点が多いことを強く示唆している。

さらに、Bat1、Bat2 の一次構造は高い相同性を示し、その触媒反応機構も明らかにされているものの、Bat1 および Bat2 は細胞内で局在する場所でのみ完全な機能を発現するという結果も報告されている (N. Takpho *et al.*, *Microb. Cell*, 2018)。この結果は、BCAT の一次構造の相違が、その機能の違いに影響を与えていることを示しているが、詳細については不明である。

2. 研究の目的

これまでに Bat1 に特定のアミノ酸置換が存在する産業酵母株において、BCAA 含量や発酵液中の香気成分量が変化することが見出されている。本研究課題では、これらの解析で明らかになった Bat1 のアミノ酸置換 Ala234Asp (A234D) Ala296Thr (A296T) が Bat1 の生理的機能に与える影響について解析を行った。

3. 研究の方法

Bat1 における A234D および A296T のアミノ酸置換についての解析を行うために、実験室酵母 *S. cerevisiae* BY4741 株 (WT) の BAT1 破壊株 ($\Delta bat1$) を宿主株として、野生型 BAT1 あるいは BAT1^{A234D}、BAT1^{A296T} および BAT1^{A234D/A296T} 変異を導入した形質転換体 [WT、Bat1(A234)、Bat1(A296T)、Bat1(A234D/A296T)] をそれぞれ作製した。これらを最少培地 (SD 培地) で培養し酵母の生育への影響について確認するとともに、LC/MS による酵母細胞内 BCAA 含量の測定、GC/MS により培養液中のフーゼルアルコール含量の測定を行った。さらに、Bat1 と 43.77% の相同性を持つヒトミトコンドリア BCAT (PDB ID: 1KTA) をテンプレートにホモロジーモデリングを行うことで、変異型 Bat1 の立体構造について解析を行った。

4. 研究成果

1) 変異型 Bat1 発現株の作成と細胞内 BCAA 含量

実験室酵母に Bat1^{WT}、Bat1^{A234D}、Bat1^{A296T} および Bat1^{A234D/A296T} を発現させ、その生育を確認した結果、A234D のアミノ酸置換を導入した 2 株において $\Delta bat1$ と同程度の生育遅延が認められた (図 1)。培養開始 16 時間後の細胞を回収し、細胞内 BCAA 含量を測定した結果、A234D を導入した 2 株において、バリン含有量が有意に低下していることが明らかとなった (図 2)。ウエスタンブロットによる解析の結果、各変異型

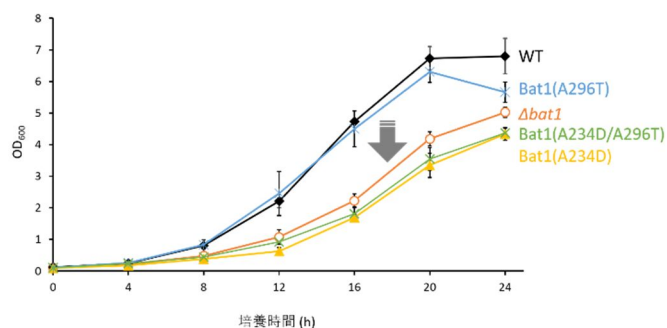


図1 変異型Bat1発現株の生育曲線

Bat1 は細胞内で Bat1 と同程度の発現量を示したことから、A234D のアミノ酸置換により Bat1 の機能不全が引き起こされることが示唆された。

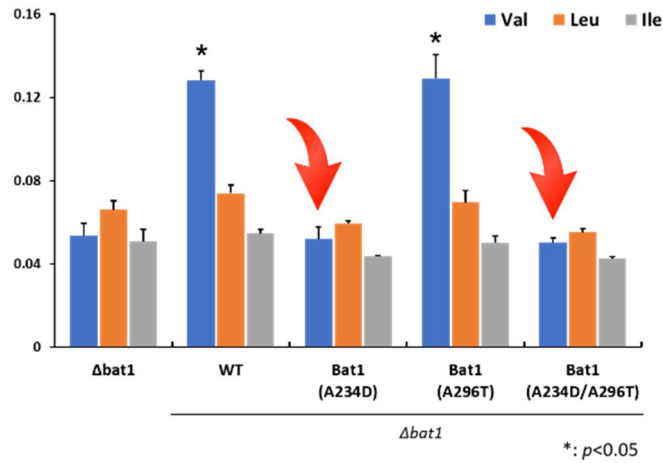


図2 変異型Bat1発現株の細胞内BCAA含量

2) 変異型 Bat1 発現株のフーゼルアルコール生成能

酵母における BCAA の異化（分解）経路としてエーリッヒ経路が知られている。同経路において BCAA は、Bat2 により α -オキシイソ吉草酸（KIV）、 α -ケトイソカプロン酸（KIC）および α -ケト- β -メチル吉草酸（KMV）などの α -ケト酸に変換される。またミトコンドリアから細胞質中に移動した α -ケト酸は α -ケト酸脱炭酸酵素（KDC）とアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）の作用を受け、それぞれイソブタノール（KIV 異化産物）あるいはアミルアルコール（KIC・KMV 異化産物）などの高級アルコール（フーゼルアルコール）に変換される（図3）。これまでの報告で、Bat1 破壊株においてイソブタノール生産量が増加していることが明らかになっている（Hammer and Avalos, *Metab. Eng.* 2017）。これらのアミノ酸置換がフーゼルアルコールの生合成に与える影響について解析するために、培養液中に含まれるフーゼルアルコール含量を GC/MS を用いて定量した（図4）。その結果、 $\Delta bat1$ と比較して Bat1(A234D)ではイソブタノールおよびアミルアルコール生成量に変化は認められなかったものの、WT および Bat1(A296T)では有意にフーゼルアルコール生成量が約 25%まで減少した。この実験結果から、A234D のアミノ酸置換の導入により Bat1 が不活化され、その結果ミトコンドリア内で過剰に生成された KIV や KMV が細胞質に流出することでフーゼルアルコールの生合成量が増加したと考えられた。また、Bat1(A234T)では WT と比較してフーゼルアルコール生成量が約 40%上昇した。この結果から、Bat1 における A296T のアミノ酸置換は機能を保持しつつフーゼルアルコール生合成量の増加に寄与していると考えられた。これらの結果から、Bat1 への A234D および A296T アミノ酸置換の導入は、酵母におけるフーゼルアルコール生産性の向上に寄与することが示唆された。

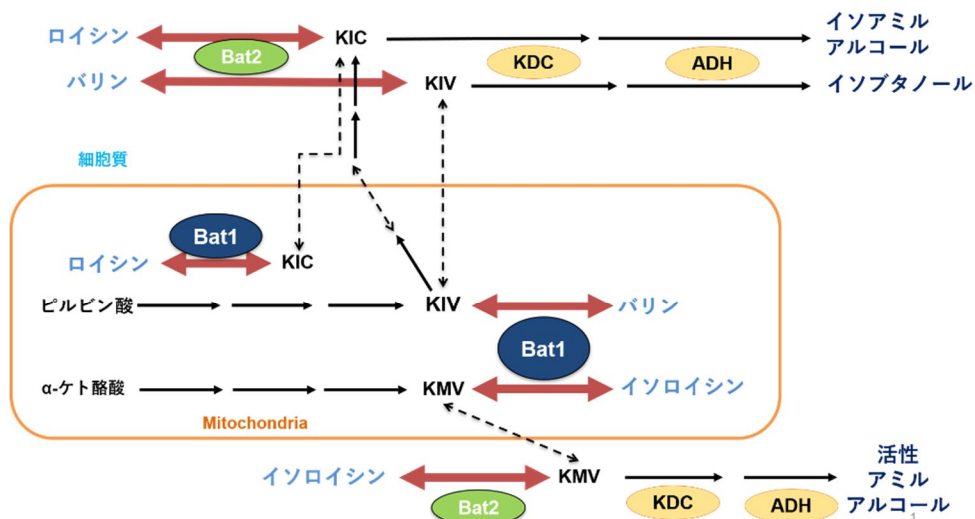


図3 *S. cerevisiae*におけるBCAA代謝経路

3) 変異型 Bat1 の分子モデリング解析

A234D および A296T のアミノ酸置換が Bat1 の立体構造上での機能を明らかにすることを目的に、Bat1 のホモロジーモデリングを行い、変異型 Bat1 の立体構造について解析を行った (図 5)。その結果、Ala234 および A296 は Bat1 の活性中心付近に位置していたものの、両アミノ酸残基ともに基質となる KIV との酵素-基質複合体の形成に直接的に影響を及ぼしていないことが示唆された。

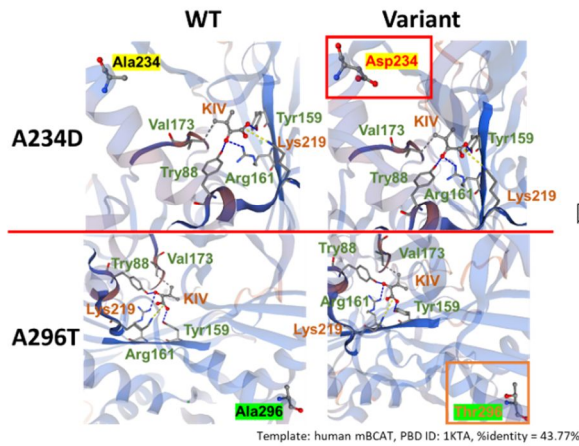


図5 Bat1^{A234D} および Bat1^{A296T} の分子モデリング解析

高生産に関する研究がこれまでに多数報告されている。また、 $\Delta bat1$ 株を利用したフーゼルアルコール高生産に関する研究も複数報告されている。そのような中、本研究課題では BAT1 へ変異を導入することにより、その生産性を向上することができると初めて明らかにした。また、Bat1 へのアミノ酸置換の導入による Bat1 の不活化に関する報告は、活性中心部位における触媒部位のリジン (K219) を他のアミノ酸に改変し不活化させた報告のみである (Kingsbury *et al.*, *PLoS Genet.*, 2015)。A234D のアミノ酸置換の導入による Bat1 不活化は、アミノ酸置換を起因とした活性中心部位の直接的な相互作用の変化によるものではないことが考えられた。

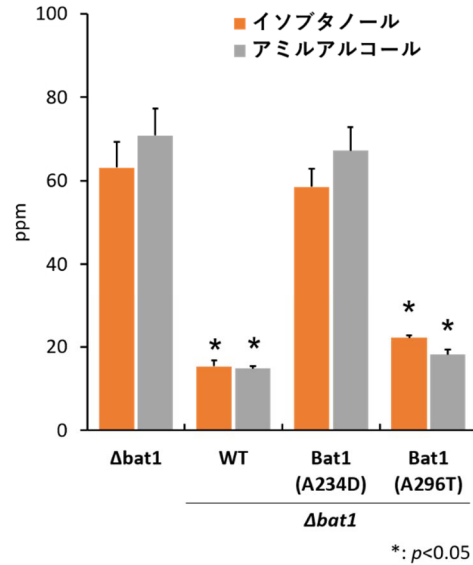


図4 変異型 Bat1 発現株のフーゼルアルコール生産量

本研究課題において、Bat1 へのアミノ酸置換 A234D および A296T の導入が、酵母でのフーゼルアルコール生産性の向上に寄与することが示された。フーゼルアルコールのうち、イソブタノールは次世代バイオ燃料として注目されており、酵母を用いたイソブタノール

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Koonthongkaew Jirasin, 豊川洋一, Christopher Large, Maitreya Dunham, 高木博史
2 . 発表標題 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における分岐鎖アミノ酸代謝の機能解析
3 . 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部2019年度合同神戸大会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Koonthongkaew Jirasin, Yoichi Toyokawa, Christopher Large, Maitreya Dunham, Hiroshi Takagi
2 . 発表標題 Functional analysis of branched-chain amino acids (BCAAs) biosynthesis in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3 . 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4 . 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----