

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05803

研究課題名(和文)ユニークな特徴を持つPDH-ODHハイブリッド酵素複合体の分子構造と活性調節機構

研究課題名(英文)The molecular architecture and regulation of the PDH-ODH hybrid complex

研究代表者

古園 さおり (Kosono, Saori)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：90321760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Corynebacterium glutamicumにおけるユニークなPDH-ODHハイブリッド複合体について、サブユニット組成比を含む分子構造基盤を明らかにした。ハイブリッド複合体は大腸菌など他生物種に比べコンパクトなサイズの複合体であることがin vivoとin vitroの両方から明らかとなった。また、2つのE1サブユニットのCgE2サブユニットに対する結合親和性の違いや、CgE2-PSBDドメインのアセチル化、CgE1o多量体形成など、PDHおよびODH活性を柔軟に調節する機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Corynebacterium glutamicumにおけるユニークなPDH-ODHハイブリッド複合体の分子構造基盤を初めて詳細に明らかにした。また、2つのE1サブユニットのCgE2への結合親和性の違いや、CgE2-PSBDドメインのアセチル化、CgE1o多量体形成など、PDHおよびODH活性を柔軟に調節する機構の一端を明らかにした。PDHおよびODH活性調節は中心炭素代謝フロー制御に重要な役割を持つため、これらの成果はC. glutamicumを用いた有用物質生産の代謝デザインに重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pyruvate dehydrogenase (PDH) and 2-oxoglutarate dehydrogenase (ODH) from Corynebacterium glutamicum exist as a unique hybrid complex in which CgE1p and CgE1o simultaneously associate with the CgE2-CgE3 subcomplex. In this study, we have elucidated the molecular structure of the hybrid complex, including the subunit composition. In vivo and in vitro studies revealed that the hybrid complex has a compact size compared to PDH and ODH from E. coli. In addition, the existence of mechanisms that flexibly regulate PDH and ODH activities, including differences in the binding affinities of the two E1 subunits for the CgE2 subunit, acetylation of the CgE2-PSBD domain, and CgE1o multimerization, was suggested.

研究分野：応用微生物学

キーワード：2-オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体 PDH ODH Corynebacterium リジンアセチル化 グルタミン酸生産

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH)と 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (ODH)は 2-オキソ酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する代謝酵素複合体で、生物に広く存在し中心炭素代謝の要を担っている。PDH と ODH は多くの生物種では別個の複合体として存在するが、*Corynebacterium glutamicum* では CgE2・CgE3 部分複合体に CgE1p と CgE1o が会合するユニークなハイブリッド複合体として存在する(図1)。PDH と ODH の 2 つの活性が 1 つの複合体に共存することは、CgE1p と CgE1o の会合比の変化による PDH と ODH 活性のバランス制御、さらには中心炭素代謝フロー制御に重要な意義を持つ可能性が考えられた。

筆者らによる *C. glutamicum* ライゼートを用いた超遠心分析実験結果から、上記のハイブリッド複合体は大腸菌由来の PDH や ODH に比べて予想外に小さい分子量を持つことが示唆されていた。また、CgE1p や CgE1o タンパク質が CgE2 を含まない高分子画分に沈降していたことから、これらのサブユニットが自身で多量体形成するか、CgE2 以外の未知タンパク質と相互作用する可能性が考えられた。

筆者らのアセチローム・スクシニローム解析により、CgE2 サブユニットの PSBD (peripheral subunit binding domain)ドメインにリジンアセチル化部位を見出していた。一般に E2 サブユニットは PDH/ODH 複合体の中核を構成し、その PSBD ドメインには E1 と E3 サブユニットが会合する。CgE2-PSBD ドメインのアセチル化は E1/E3 サブユニット会合に影響を与え、PDH/ODH 活性に影響を与える可能性が考えられた。また、ODH 活性に必須な CgE1o サブユニットが E1o ドメインと E2 ドメインを含むマルチドメインタンパク質である点も特徴的であった(図2)。

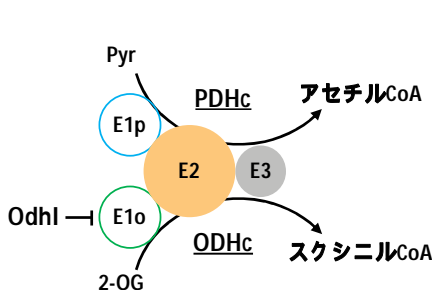


図1 PDH-ODHハイブリッド酵素複合体

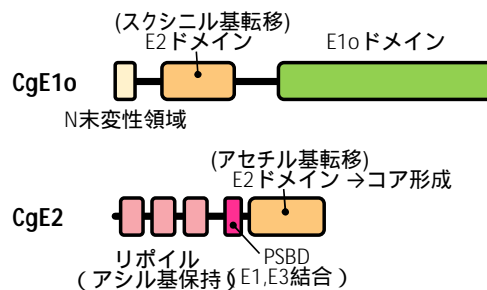


図2 CgE1oとCgE2サブユニットのドメイン構造

2. 研究の目的

本研究では、上述のようなユニークな特徴を有する *C. glutamicum* の PDH-ODH ハイブリッド酵素複合体について、サブユニット組成比を含む分子構造基盤を明らかにし、アセチル化などの翻訳後修飾やサブユニット間相互作用を介した新規な活性調節機構の解明を目的とした。また複合体の分子量が小さいと予想されることは構造解析を行う上で有利な点と考え、まだ誰も明らかにしていないハイブリッド複合体の分子構造の解明を目指した。

3. 研究の方法

CgE1p, CgE1o, CgE2, CgE3 サブユニットおよび OdhI の大腸菌組換えタンパク質は、His タグ融合タンパク質として大腸菌で生産、アフィニティー精製により調製した。CgE2・CgE3 部分複合体は CgE3 への His タグ付加による共精製により取得した。精製した CgE2・CgE3 部分複合体と CgE1p または CgE1o を混合し氷上で 30 分置くことで、PDH と ODH を再構成した。PDH および ODH 活性測定は、それぞれピルビン酸と 2-オキソグルタル酸を反応基質とし、反応による APAD+還元を 365 nm 吸光変化で観測することにより行なった。CgE2・CgE3 部分複合体および ODH 複合体の分子量測定は、ゲルろ過クロマトグラフィーでの標準分子量タンパク質との比較により行なった。

CgE2-PSBD アセチル化部位を置換した *C. glutamicum* 株の作製は、2 段階相同組換えによりまず CgE2 遺伝子欠損株を作成し、これにアミノ酸置換を含む CgE2 遺伝子を再導入することにより行なった。CgE2 置換体と CgE1p および CgE3 との相互作用は、大腸菌組換えタンパク質を用いたプルダウンアッセイにより調べた。

CgE1o 多量体の構造解析は、まず CgE1o 多量体画分をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、結晶化スクリーニングにより複数の条件でタンパク質結晶を得た。得られたタンパク質結晶を用いて X 線結晶構造解析およびクライオ電顕解析を実施した。

4. 研究成果

(1) In vitro 再構成系を用いたハイブリッド複合体のサブユニット構造と PDH と ODH 活性バ

ランス制御に関する解析

CgE1p, CgE1o, CgE2, CgE3 サブユニットの大腸菌組換えタンパク質を調製し、これを用いて PDH と ODH の *in vitro* 再構成系を確立した。CgE2・CgE3 部分複合体に CgE1p または CgE1o を添加することにより、それぞれ PDH と ODH 活性を検出することができた。ODH 再構成サンプルをゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ、CgE2・CgE3 と CgE1o を含む ODH 複合体と考えられるピーク画分を検出した。標準タンパク質分子量との比較から CgE2・CgE3 部分複合体および ODH 複合体の分子量を推定した。その結果、CgE2・CgE3 部分複合体は 6 分子 (3 量体×2) の CgE2 と 8 分子 (2 量体×4) の CgE3 で構成され、ODH 複合体におけるサブユニット組成比は CgE1o:CgE2:CgE3=4:6:8 と推定された。

一方、活性を示した PDH 再構成サンプルをゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ、CgE2・CgE3 と CgE1p は別々の画分に溶出し、PDH 複合体に相当するピーク画分は検出できなかった。この結果から、CgE2 に対する CgE1p の結合は CgE1o と比べて弱いことが示唆された。

CgE2・CgE3 に対し CgE1p を PDH 活性が飽和する濃度まで添加し、この再構成 PDH に CgE1o を添加すると PDH 活性の阻害が観察された。同様に再構成した ODH に対する CgE1p の添加でも PDH 活性阻害が観察されたが、前者と比べて阻害効果は弱かった。この結果から、一定量の CgE2・CgE3 に対し CgE1p と CgE1o の存在量比が変化することで PDH と ODH 活性のバランスが変化しうることが示唆された。また、CgE2 に対する CgE1p の結合が CgE1o に比べて弱いことがこの結果からも支持された。

CgE1p は他生物種の E1p と同様に溶液中で 2 量体として存在したが、CgE1o は安定な多量体を形成することが判明した。ライゼートをを用いた超遠心分析実験で CgE1p と CgE1o が CgE2 を含まない高分子側画分に沈降していた結果と合わせると、CgE1p は細胞内で未知のタンパク質と相互作用する可能性が示唆され、CgE1o は多量体形成を反映していたと考えられる。

制御因子 OdhI による ODH 活性阻害は炭素フローをグルタミン酸生成へ向けるため、グルタミン酸発酵生産にとって重要な意味を持つ。OdhI は CgE1o に結合することにより ODH 活性を阻害することが知られているが、CgE1o を複合体から乖離させるのか、それとも ODH 複合体に結合して複合体を不活化するのか明らかにされていなかった。再構成した ODH に OdhI を添加すると確かに ODH 活性の阻害が観察され、ゲル濾過クロマトグラフィーでは OdhI は ODH 複合体と同じ画分に溶出された。従って、OdhI は ODH 複合体から CgE1o を解離させるのではなく、ODH 複合体に結合してこれを不活性化することが明らかとなった。

(2) CgE2 サブユニットの PSBD ドメインに見出されたアセチル化部位(Lys391)の機能解析

一般に E2 サブユニットの PSBD ドメインは E1 および E3 サブユニットが結合する部位であり(図 2)、その修飾や変異はサブユニット会合さらには活性に影響を及ぼすことが予想される。CgE2-PSBD ドメイン内のアセチル化模倣置換体(K391Q)では CgE1p および CgE3 サブユニットに対する結合が低下していることを、プルダウンアッセイとゲルろ過クロマトグラフィーを用いた解析により明らかにした。一方、CgE1o サブユニットに対する結合には影響がなかった。また非アセチル化模倣置換体(K391R)では K391Q に比べてサブユニット結合への影響は少なかった。これらの結果から、Lys391 は CgE1p および CgE3 サブユニットの結合に重要な残基であり、そのアセチル化は PDH 活性を優先的に阻害することが示唆された。

次に、K391Q または K391R 置換を有する *C. glutamicum* 株より調製したライゼートを用いて見かけ上の酵素反応パラメータを算出したところ、K391Q では PDH および ODH 反応の V_{max} が低下しており、PDH 反応への影響がより大きかった。また、ピルビン酸および 2-オキソグルタル酸に対する K_m 値が低下していた。

興味深いことに、K391R 株では 10~20%のグルタミン酸生産の上昇が観察されていた。上記で得られた酵素反応パラメータを用いて各ピルビン酸濃度に対する PDH 活性を評価したところ、K391R 型は低濃度 (1 mM 以下) のピルビン酸濃度で野生型よりも高い活性を示すことが判明した。K391R 株では低濃度ピルビン酸に対する PDH 反応性が上昇していることが、クエン酸回路への炭素フローとグルタミン酸生産の増加に繋がったと考えられた。

(3) CgE1o 多量体に関する解析

CgE1o は 1221 アミノ酸からなり、N 末側領域に特定の構造を取らない変性領域 (1~120 アミノ酸残基)、続いてスクシニル基転移を担う E2 ドメイン、2-オキソグルタル酸の脱炭酸反応を担う E1o ドメインより構成されるマルチドメインタンパク質である(図 2)。一般に E1o サブユニットは 2 量体として存在することが知られているが、CgE1o は溶液中で安定な多量体を取ることを明らかにした(上述)。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量測定により、CgE1o 多量体は 4 または 6 量体と推定された。N 末変性領域を欠失させると *in vitro* で ODH 活性を再構成できなくなり、また多量体形成も見られなくなった。この結果から、N 末領域は CgE2 サブユニットとの会合による ODH 複合体の形成と自身の多量体形成の両方に必要であり、CgE1o が ODH 複合体と自身の多量体の 2 つの状態を行き来することにより、ODH 活性を柔軟に調節する機構の存在が考えられた。CgE1o 多量体の高次構造を明らかにする目的で、タンパク質結晶を用いた X 線構造解析とクライオ電顕解析に取り組んだ。予備的な実験結果であるが、CgE1o 多量体は 2 量体を基本とした高次構造を持つことが示唆された。

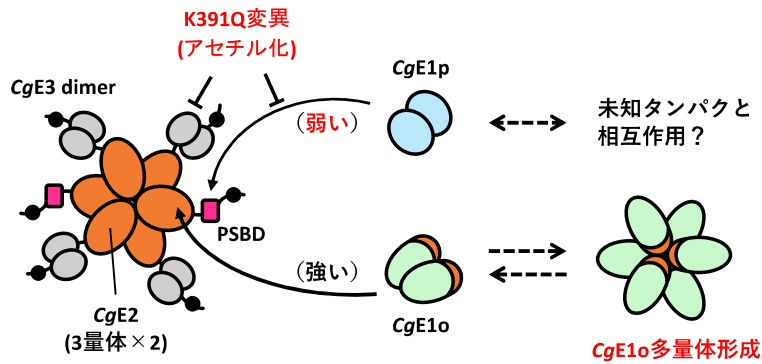


図3 PDH-ODHハイブリッド複合体の推定サブユニット構造と調節機構

得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

本研究で得られた成果を図 3 に要約した。ハイブリッド複合体のサブユニット構造が明らかとなり、大腸菌など他生物種に比べコンパクトなサイズの複合体であることを *in vivo* と *in vitro* の両方から明らかにした。大腸菌の PDH と ODH の複合体コアは 24 分子の E2 で構成されるが、*C. glutamicum* では 6 分子の CgE2 で構成されることが考えられる。最近 CgE2 の 3 量体構造が明らかにされ (Bruch et al. PNAS 2021, 118, e2112107118)、おそらく 3 量体×2 の複合体コアを持つと推定される。複合体のサイズが小さいことは、CgE1p と CgE1o の会合変化により PDH と ODH の活性バランスに影響を与えやすいと考えられる。また、CgE1p と CgE1o の CgE2 への結合親和性の違いや、CgE2-PSBD ドメインのアセチル化、CgE1o 多量体形成など、PDH および ODH 活性を柔軟に調節する機構の存在が示唆された。

今後の展望

他生物種では報告例のない CgE1o 多量体や ODH 複合体の分子構造を明らかにすることで、サブユニット間相互作用を介した柔軟な ODH 活性調節機構について知見が得られると期待される。また、まだ活性でしか捉えられていない PDH 複合体を *in vitro* で安定的に捉える条件を見出すことができれば、ハイブリッド複合体の分子構造を解明する道筋が得られると期待される。さらに CgE1p と相互作用する未知タンパク質の同定を含め、ユニークなハイブリッド複合体の全貌を明らかにすることにより、本菌を用いた有用物質生産の代謝デザインに重要な知見をもたらすことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komine-Abe Ayano, Kondo Naoko, Kubo Shosei, Kawasaki Hisashi, Nishiyama Makoto, Kosono Saori	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of lysine acetylation in the peripheral subunit-binding domain of the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase-2-oxoglutarate dehydrogenase hybrid complex from <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 874 ~ 881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinugawa Hirokazu, Kondo Naoko, Komine Abe Ayano, Tomita Takeo, Nishiyama Makoto, Kosono Saori	4. 巻 9
2. 論文標題 In vitro reconstitution and characterization of pyruvate dehydrogenase and 2 oxoglutarate dehydrogenase hybrid complex from <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e1113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.1113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小峰（阿部）理乃, 近藤直子, 久保翔世, 西山真, 古園さおり
2. 発表標題 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 由来PDH-ODHハイブリッド複合体のE2サブユニットPSBDアセチル化部位の機能解析
3. 学会等名 2020年度グラム陽性細菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古園さおり
2. 発表標題 細菌のタンパク質アシル化修飾と制御、個性、記憶 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> のグルタミン酸生産を例に
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会フォーラム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Saori Kosono	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature Switzerland	5. 総ページ数 24
3. 書名 Post-translational modifications in Corynebacterium glutamicum In Microbiology Monographs Corynebacterium glutamicum	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------