

令和 5 年 6 月 5 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：20K05804

研究課題名（和文）機能未知酵素ホモログによるアシルCoA代謝調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of acyl-CoA-related enzymes by enzymatically inactive enzyme homolog

研究代表者

吉田 彩子（Yoshida, Ayako）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：90633686

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）：補酵素A（CoA）は生物にとって最も重要な補酵素の一つであり、アシルCoAは生体内で起こる様々な化学反応に基質や中間体として関与している。よってアシルCoAの合成に関わる酵素の機能や調節機構を理解することは、細胞内代謝の全体像の理解を目指す上で重要である。本研究では高度好熱菌*Thermus thermophilus*においてアシルCoA合成に関わるCoA転移酵素やアシルCoA合成酵素において、「酵素活性を持たない機能未知酵素ホモログ」がその機能調節に関与するという興味深い現象を見出し、その制御機構を遺伝生化学、分子生物学、構造生物学的な手法を用いて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アシルCoAはアミノ酸や脂肪酸をはじめとした様々な物質のビルディングブロックとして利用されるため、CoATやACSによるアシルCoAの生成は微生物を用いた様々な有用化合物生産においても重要な反応である。これら酵素の制御機構を理解することでより効率的な物質生産系に役立てることができると考えられる。また、一見するとpseudogeneである酵素ホモログが、実は酵素活性調節や遺伝子発現調節において酵素活性とは別の機能をもつという点は、遺伝子配列からの機能予測の限界を超え、生体内の代謝反応の理解の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Coenzyme A (CoA) is one of the most important coenzymes, and acyl-CoA is involved as a substrate or intermediate in various chemical reactions in vivo. Therefore, it is important to understand the functions and regulatory mechanisms of enzymes involved in acyl-CoA synthesis for the understanding of cellular metabolism. In this study, we found an interesting phenomenon in *Thermus thermophilus*, in which "enzymatically inactive enzyme homologues" are involved in the regulation of CoA transferases and acyl-CoA synthases, and investigated the regulatory mechanism of these enzymes using genetic biochemistry, molecular biology, and structural biology methods.

研究分野：応用微生物学

キーワード：代謝調節 アシルCoA 短鎖脂肪酸 *Thermus thermophilus* 機能未知酵素ホモログ

1. 研究開始当初の背景

補酵素 A (CoA) は補酵素の一つであり、脂肪酸が CoA とのチオエステル結合により活性化されたアシル CoA は、生体内の様々な反応における主要な中間体として機能する。そのためアシル CoA 生成反応機構や調節機構を理解することは、アシル CoA と関わりのある多くの細胞内代謝反応の理解につながると考えられる。ATP を消費して酢酸からアセチル CoA を合成するアセチル CoA 合成酵素 (ACS) については広く研究されており、タンパク質の翻訳後修飾の一つのリジンアセチル化によって活性が負に制御されることが知られている。タンパク質アセチル化の基質としてアセチル CoA が用いられるため、この活性調節機構は ACS によるアセチル CoA 合成量の調節に関わり、酢酸の炭素源としての利用性を制御している。

我々は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を対象にタンパク質アセチル化に関して研究を行う中で、*T. thermophilus* 内で高度にアセチル化されるタンパク質として、CoA 転移酵素 (CoAT) を同定した。CoAT は ATP 非依存的に、アセチル CoA の CoA 部位を短鎖脂肪酸に転移し、アシル CoA を生成する酵素である。上記の ACS におけるアセチル化による制御とのアナロジーから、CoAT もアセチル化によって活性調節を受けることが示唆されたが、CoAT はアセチル化だけでなく、アラニン脱水素酵素とアノテーションされながらもその活性を持たないホモログ酵素 (ADLP) と相互作用し、翻訳後修飾と制御タンパク質との相互作用によって複雑に制御されることがわかってきた。ADLP は NAD(H) を結合し CoAT の活性調節を行うが、制御機構の構造基盤は明らかになっていなかった。

また、*T. thermophilus* は ATP 依存的なアシル CoA 合成を担い、アセチル化による制御が他の細菌においてよく研究されている ACS ホモログを 4 つ持ち、そのうち ACS2 は転写因子と ACS の融合タンパク質であると予想される。我々の 4 つの ACS ホモログの予備的な機能解析の結果、ACS2 はアシル CoA 合成活性を示さない一方で、その遺伝子破壊株は、ACS が主にその資化にかかわる酢酸を単一炭素源とする培地で生育しないことから、ACS など酢酸資化に関わる遺伝子の発現制御や酵素活性制御に関わることが示唆されていた。しかしながら、酵素活性を持たない ACS2 の酢酸代謝調節における機能や調節機構などは明らかになっておらず、またなぜ本菌が CoAT や ACS を通じて CoA 体及び脂肪酸代謝を複雑に制御しているのか、細胞内の NAD⁺/NADH に代表されるエネルギー代謝との関連など生理的意義の解明には至っていなかった。

2. 研究の目的

高度好熱菌 *T. thermophilus* の持つアシル CoA 合成に関わる CoAT や ACS において、一見すると pseudogene と思われる「酵素活性を持たない機能未知酵素ホモログ」がその機能調節に関与するという興味深い現象を見出している。本研究では、好熱菌の CoA 体代謝酵素の機能未知酵素ホモログを介した新規な調節機構の詳細、およびこの調節機構のエネルギー代謝や脂肪酸代謝などの細胞内の様々な代謝反応における生理的な意義を、微生物生理学、遺伝生化学、構造生物学的な手法を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CoAT の ADLP との相互作用及びアセチル化による活性調節の構造基盤の解明

CoAT の活性調節に関わる制御タンパク質 ADLP は NAD⁺ と NADH のどちらも結合できるが、NAD⁺ のみが CoAT 活性に影響を与える。一般的にアラニン脱水素酵素などのアミノ酸脱水素酵素は補酵素や基質の結合に伴い構造が変化しその活性を発揮するため、ADLP への NAD(H) の結合が ADLP 及び CoAT-ADLP 複合体の何らかの異なる構造変化を誘引し、CoAT の活性阻害をもたらすと考えられた。調節機構を分子レベルで明らかにするため、ADLP 単体や CoAT-ADLP 複合体の NAD(H) 存在下での X 線結晶構造解析を行った。また CoAT へのアセチル化の影響も調べるため、アセチル化体 CoAT に対しても同様に X 線結晶構造解析を行った。また NAD(H) の ADLP への結合が CoAT と ADLP 間の相互作用アフィニティーへ与える影響について等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いて解析した。

(2) ADLP の NAD⁺/NADH センサーとしての生理的役割の解明

ADLP が細胞内の NAD⁺/NADH センサーとして機能し CoAT 以外の酵素とも相互作用することで代謝制御に関わる可能性を考えた。ADLP の生理的役割を解明するためその遺伝子破壊株の生育試験や、アフィニティタグを付加した ADLP を発現する *T. thermophilus* の変異株を利用した pull-down assay により ADLP との相互作用タンパク質の探索を試みた。

(3) 4 つの ACS ホモログの機能及び活性を示さない ACS ホモログの制御機能の解明

T. thermophilus には ACS とアノテーションされる遺伝子が 4 つ存在し、そのうち ACS2 は ACS ドメインに加え N 末側に転写因子ファミリーの Ie1R が存在する融合タンパク質である。酵素活

性が見られている ACS2 以外の 3 つの ACS ホモログについて、酢酸やその他の短鎖脂肪酸を基質とした活性についての詳細を調べることで、それぞれの役割を明らかにする。

予備的解析から ACS2 は酵素活性を示さない一方で、ACS2 の遺伝子破壊株は ACS2 がアセチル CoA を合成できないにも関わらず酢酸を単一炭素源にした最少培地において生育しない。ACS2 に存在する Ic1R は大腸菌において、酢酸の資化に関わる ACS やグリオキシル酸回路の遺伝子の発現調節に関わるとされている。ACS2 が他の ACS ホモログや酢酸資化に関わる遺伝子の発現調節に関わることが予想されたため、野生株や *acs2* 破壊株の酢酸培地生育下での ACS などの遺伝子発現量を定量 PCR にて比較し、ACS2 が転写因子として機能する可能性を検証した。また、ACS2 が結合すると考えている遺伝子領域に対するゲルシフトアッセイを行い ACS2 の転写調節因子としての機能やその DNA 結合部位の同定を試みた。ACS2 は Ic1R のリガンド結合部位と ACS の基質結合部位にエフェクターとなる低分子を結合し得るので、候補低分子存在下におけるゲルシフトアッセイにより転写調節に関わるシグナル分子の同定も試みた。さらに、ACS ホモログの X 線結晶構造解析を行うことで、それぞれの ACS の基質特異性や活性発現の分子機構、及び ACS2 による制御機構の構造基盤の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) CoAT の ADLP との相互作用及びアセチル化による活性調節の構造基盤の解明

タンパク質翻訳後修飾と制御タンパク質との相互作用により複雑に活性調節されることが示唆されている CoA transferase (CoAT) について、その制御機構の詳細を明らかにするため CoAT-ADLP 複合体の結晶構造解析に取り組んだ。定法の大腸菌から調製した組換えタンパク質に加え、CoAT のアセチル化酵素を共生産させる大腸菌株を用いて調製したアセチル化体の CoAT と ADLP の複合体、さらに *T. thermophilus* から精製した複合体といった様々なタンパク質の結晶化を試みた。しかしながら結晶は得られるものの ADLP 単体の結晶であり X 線結晶構造解析での複合体構造決定には至らなかった。ADLP のホモログであるアラニン脱水素酵素は NAD(H) の結合により構造変化することが報告されていることから、ADLP も NAD(H) の結合に伴い構造変化することが予想された。ADLP の NAD⁺結合型、非結合型の結晶構造を決定したところ、NAD⁺結合型では非結合型に比べて開いた構造をとることが分かった (図 1)。また、ITC による CoAT と ADLP の結合解析を行ったところ、NAD⁺存在下において CoAT に対する ADLP の親和性が上昇することが明らかとなった。つまり NAD⁺結合に伴う ADLP の構造変化により CoAT との相互作用が制御されていることが明らかとなった。CoAT と ADLP 複合体の結晶構造解析が難航したため、最終年度にはクライオ電子顕微鏡での構造決定を試みた。その結果 NAD⁺の存在下、非存在下での良好なマップが得られ (2.4 - 2.7 Å)、現在モデル構築を進めている。得られたマップには ADLP に結合する CoAT の数によって複数パターンが存在しており、CoAT-ADLP 複合体の不均一性が結晶化を困難にしていることが示唆された。

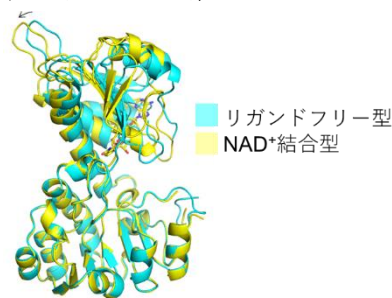


図1. ADLPのNAD⁺結合に伴う構造変化

(2) ADLP の NAD⁺/NADH センサーとしての生理的役割の解明

ADLP は NAD⁺存在下では CoAT 活性を阻害するが、NADH 存在下では影響を与えない。実際 ADLP の NAD⁺、NADH に対する親和性を ITC により解析したところ、NAD⁺ ($k_d = 3.1 \mu\text{M}$) よりも NADH ($k_d = 0.34 \mu\text{M}$) の方が ADLP に強く結合することが明らかとなった。これと一致し、CoAT 活性の NAD⁺による阻害はその 1/10 の NADH の添加により緩和され、ADLP が NAD⁺/NADH 比のセンサーとして働くことが示された。CoAT 以外のタンパク質と相互作用して細胞内の酸化還元状態に応答してその活性を調節する可能性を考え、*T. thermophilus* において ADLP の pull-down assay を行った。しかしながら、CoAT 以外に ADLP と結合するタンパク質は見いだせていない。また、ADLP をコードする遺伝子破壊株の生育試験を最少培地やその炭素源を変えた培地を用いて行ったが、顕著な生育の差はなく、ADLP の *in vivo* での役割には迫れなかった。

(3) 4 つの ACS ホモログの機能及び活性を示さない ACS ホモログの制御機能の解明

T. thermophilus に 4 つ存在する ACS ホモログのうち主に ACS 活性を持たず転写因子 (Ic1R) ドメインとの融合タンパク質である ACS2 に着目して研究を進めた。*acs2* 破壊株は ACS 活性を持つ *acs1* 破壊株と同様に、ACS 活性がその資化に重要である酢酸を単一炭素源とした最少培地で生育できないことから、ACS2 が *acs1* をはじめとした酢酸資化に関わる遺伝子の発現制御に関わることが示唆されていた。そこで、本遺伝子の破壊株や相補株を用いた qRT-PCR による *acs* 遺伝子の発現レベルの解析を行った。その結果、ACS2 が酵素活性をもつ *acs* ホモログ (*acs1*) の培地条件依存的な転写誘導に関与することが明らかとなった。ACS2 によって遺伝子発現が調節される遺伝子の upstream には回文配列が存在し、ACS2 の転写因子ドメイン内の DNA 結合領域が結合するものと考えられた。そこで、推定 DNA 結合残基の変異体が *acs2* 破壊株の酢酸培地での生育を相補するか調べたところ、相補が見られなくなったため、ACS2 が確かに DNA 結合能を持つこと

が示唆された。続いて ACS2 の *acs1* 上流領域への結合をゲルシフトアッセイを用いて直接的に示したいと考えたが、ACS2 全長の組換えタンパク質を、様々な条件検討（培養・発現誘導条件、宿主の検討、コドン最適化、近縁種由来のホモログの利用など）を行っても取得することができなかった。同様の検討を転写因子ドメインのみに対しても行い、大腸菌のコドン使用頻度に対して最適化した人工遺伝子を用いることで、組換えタンパク質の調製に成功した。得られた ACS2 転写因子ドメインを用いて

acs1 上流配列に対するゲルシフトアッセイを行ったところ、予備的なデータながら DNA とタンパク質複合体形成に伴うバンドシフトが観察できている（図 2）。さらに、ACS2 の酵素ドメイン（ACS ドメイン）の結晶構造解析を行い、アセチル CoA 合成反応の中間体が結合した構造を決定することに成功した（図 3）。結晶の非対称単位中には異なるコンフォメーションを取る ACS ドメインが存在し、ACS2 の ACS ドメインが何らかの作用により構造変化しうることが示唆された。ACS2 には転写因子ドメインに含まれるエフェクター結合ドメインに加え、ACS 反応の基質や中間体、産物が結合できると予想される ACS ドメインが存在し、またその ACS ドメインに構造変化が生じ得ることから、酵素としての機能を持たない ACS2 がその酵素ドメインをエフェクター結合を担う制御ドメインとして利用し、遺伝子発現調節を担う転写因子として機能していることが示唆された。

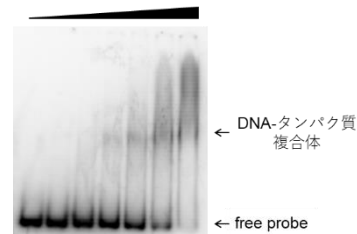


図2. ゲルシフトアッセイ

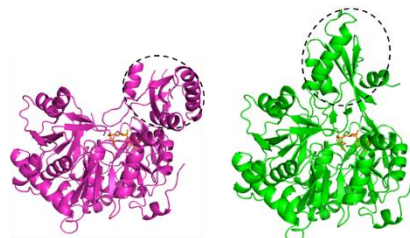


図3. ACSドメインの2つのコンフォメーション

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉田彩子 |
| 2. 発表標題 タンパク質間相互作用を介したCoA転移酵素の新規調節機構の解明 |
| 3. 学会等名 第22回 酵素応用シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉田彩子、西山真 |
| 2. 発表標題 機能未知代謝酵素ホモログが関与する短鎖アシルCoA代謝調節機構 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ayako Yoshida, Makoto Nishiyama |
| 2. 発表標題 Function and regulation of acyl-CoA synthetases from <i>Thermus thermophilus</i> |
| 3. 学会等名 2nd Japan-Switzerland-Germany Workshop on Biocatalysis and Bioprocess Development（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉田彩子、山本寛之、富田武郎、西山真 |
| 2. 発表標題 高度好熱菌由来CoA transferaseの制御タンパク質の構造機能解析 |
| 3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高島慶一郎、吉田彩子、富田武郎、葛山智久、古園さおり、西山真 |
| 2. 発表標題 高度好熱菌Thermus thermophilus HB27における短鎖アシルCoA合成酵素ホモログの構造機能解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター細胞機能工学研究室ホームページ
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/cbt/index.html>

| 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 |
|---------|---------|
| | |