

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：12101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22580075  
 研究課題名（和文）パントテン酸キナーゼによる微生物の細胞内コエンザイムA調節機構の解明  
 研究課題名（英文）Regulation mechanism of intracellular coenzyme A by pantothenate kinase in microbes  
 研究代表者  
 長南 茂 (CHOHNAN Shigeru)  
 茨城大学・農学部・准教授  
 研究者番号：70312775

研究成果の概要（和文）：コエンザイム A (CoA) は炭素のキャリアとして機能している。この重要な補酵素の生合成経路の調節機構を明らかにするため、鍵酵素であるパントテン酸キナーゼ (CoaA) を解析し、以下の点を明らかにした。①古細菌の生合成経路は、真正細菌および真核生物で機能している CoaA ではなく、古細菌固有の酵素を使っている。②枯草菌が持つ2つの CoaA ホモログはいずれも酵素活性を有しており、両酵素とも生体内で機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Coenzyme A (CoA) functions as a carbon carrier. To clarify the regulation mechanism of the biosynthetic pathway of this important coenzyme, pantothenate kinase (CoaA) being the key enzyme was analyzed, and the following points were clarified. i) The enzymes which function in archaeal CoA biosynthetic pathway are not CoaAs which is commonly used in bacteria and eukaryotes but the intrinsic ones to archaea. ii) Two CoaA homologues in *Bacillus subtilis* have the enzyme activity, suggesting the possibility that both CoaAs are active *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：パントテン酸キナーゼ、コエンザイム A、真正細菌、古細菌

1. 研究開始当初の背景  
 コエンザイム A (CoA) はビタミンB<sub>5</sub>である

パントテン酸、システインおよびATPから生合成される補酵素である。システインに由来

するCoA分子中のチオール基は有機酸のカルボキシル基と脱水縮合し、高エネルギー結合を形成する。これらの化合物はアシル-CoAと呼ばれ、生体内代謝ではアシル基のキャリアとして機能している。解糖系とTCAサイクルを連結するアセチル-CoAおよび脂肪酸合成の基質となるマロニル-CoAは細胞内代謝で良く登場する代表的なアシル-CoAである。また、これらアシル-CoAおよびCoAはエネルギー獲得系では重要な補因子として、あるいは鍵となる代謝調節のポイントにおいては炭素代謝の流れをアロステリックに調節する物質としても重要な役割を演じている。

CoAはパントテン酸から5段階の酵素反応で生合成される。初発反応、すなわちパントテン酸のリン酸化を触媒するパントテン酸キナーゼ（原核生物では CoaA、真核生物では PanK）は本合成経路の鍵酵素となっており、アミノ酸配列を基に、真正細菌では原核I型 CoaA、原核II型 CoaA、原核III型 CoaAの3種、真核生物では真核型 PanKの1種、計4種に分類されている。原核I型 CoaAと真核型 PanKは最終生産物であるCoAおよびアシル-CoAで阻害され、原核II型およびIII型 CoaAは阻害を受けないという性質を有している。残り一つのドメインを形成する古細菌に関しては、2種の経路で4'-ホスホパントテン酸を生合成することが報告されている。一つは好酸性古細菌が属する *Thermoplasmatales* 目に限定されて分布する原核I型 CoaAであり、もう一つは古細菌に固有であり、パント酸のリン酸化（パント酸キナーゼ、PoK）、そして生成したホスホパント酸へのβ-アラニンの縮合（ホスホパント酸シンターゼ、PPS）の2段階で4'-ホスホパントテン酸を合成する経路である。前者に関しては、研究代表者がpH0の環境下でも生育可能な好熱好酸性古細菌 *Picrophilus torridus* でクローニングに成功し、原核I型 CoaAに属するにも関わらず、原核I型の最大の特徴であるCoAによる最終生産物阻害を全く受けないという性質を見出した。後者の古細菌固有の合成経路に関しては、超好熱性古細菌由来 PoK および PPS が同定されている。PoKはCOG1829、PPSはCOG1701に属し、いずれも古細菌固有のタンパク質で、古細菌のゲノムDNAには広く観察される。この一方では、メタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* 由来 COG1701はパントテン酸シンターゼと同定されている。このように、後者の古細菌に見られるCOG1829およびCOG1701の機能、CoA生合成経路については未だに不明な点が残されていた。

さらに、いくつかの真正細菌のゲノムDNA上には2つのCoAホモログ遺伝子が存在する。普通は一つのCoAが細胞内で機能しており、この場合はそのCoAの性質で細胞内CoAの調節機構を予想することが可能である。しかしながら、複数のCoAが細胞内で機能している場

合はCoAの酵素学的諸性質だけで説明することは難しく、これら細菌のCoA生合成経路の調節機構は個別に解析する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は全生物の細胞内CoA濃度の調節機構を解明することであるが、本研究課題では原核生物である真正細菌と古細菌のCoA生合成経路の調節機構に焦点を絞った。CoA生合成経路は一般に鍵酵素であるパントテン酸キナーゼの段階で調節されているので、各生物のCoA生合成経路を説明するためにはパントテン酸キナーゼの特徴付けが重要となる。現在、パントテン酸キナーゼはアミノ酸配列を基に4種、そして古細菌固有の酵素であるPoKおよびPPSを合わせると、計5種が4'-ホスホパントテン酸の生合成に関わっている。この内、①PoKおよびPPSにおいては、古細菌固有のタンパク質であるCOG1829およびCOG1701の機能、そして②2つのCoAホモログを有する真正細菌においては、それぞれのCoAの生体内での役割が未解決であった。そこで、前記2項目を解析し、微生物のCoA生合成系の調節機構を解明することを目的とした。

本研究により大腸菌からヒトまでの全生物のパントテン酸キナーゼのライブラリー化および分類化が完了するので、産業界へ細胞内CoA生合成に関する基礎的データの提供が可能となる。これらの情報は、例えば、医薬品業界においては、CoAは全生物に共通に存在し、かつ多様性を有しているため、CoAをdrug targetとした選択性の高い新規抗菌剤の開発などに貢献できる。

## 3. 研究の方法

- (1) 古細菌由来パント酸キナーゼ (PoK) およびホスホパントテン酸シンターゼ (PPS) の解析

### ① *Methanospirillum hungatei* 由来遺伝子による *E. coli* ts9 株の生育相補試験

メタン生成古細菌 *M. hungatei* を用いて、COG1829 および COG1701 の発現プラスミドを構築した。図1に示したように、*M. hungatei* のゲノムDNA上では CoaBC (ホスホパントテノイルシステイン シンターゼ/ホスホパントテノイルシステイン デカルボキシラーゼ)、COG1829、および COG1701 をコードする遺伝子がクラスターを形成しており、CoaBC は Mhun\_0830 (gi 88602123)、COG1829 は Mhun\_0831 (gi 88602124)、COG1701 は Mhun\_0832 (gi

8860225) に相当する。それぞれの遺伝子を PCR で増幅し、pUC118 の *lac* プロモーターの下流に連結した (図 1)。得られたプラスミドを *CoaA* の温度感受性変異株である *E. coli* ts9 に形質転換し、100 $\mu$ g/ml アンピシリンおよび 0.1mM IPTG を含む LB 培地で 37 $^{\circ}$ C で培養した。*E. coli* ts9 株は 30 $^{\circ}$ C では生育できるが、*CoaA* に変異があるため 37 $^{\circ}$ C では生育できないという性質を示す。

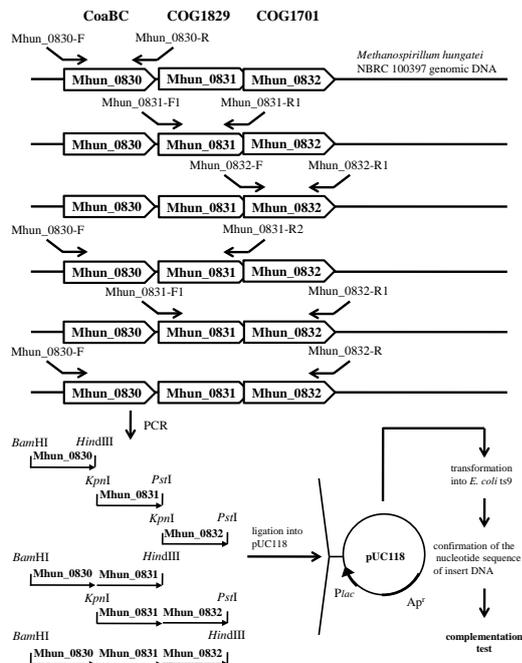


図1. *Escherichia coli* ts9株の生育相補試験に用いる発見プラスミドの構築

## ②Mhun\_0831 および Mhun\_0832 の発現と精製

Mhun\_0831 および Mhun\_0832 をコードする遺伝子を *M. hungatei* の菌体を鋳型にして PCR で増幅し、pQE-30 の T5 プロモーターの下流に連結して発現プラスミド、pQE-Mhun\_0831 および pQE-Mhun\_0832 を得た。構築されたプラスミドはシャペロンを保持する pG-Tf2 および希少コドンを含む pSC101-based プラスミドと共に *E. coli* JM109 に形質転換された。形質転換体は LB 培地で 30 $^{\circ}$ C で振とう培養され、IPTG (終濃度 0.1 mM) で目的タンパク質を誘導した。遠心集菌後、0.5M KCl、5mM 2-メルカプトエタノールを含む 20mM Tris-HCl (pH7.9) に懸濁し、氷上で超音波破碎した。遠心分離で上清を回収後、Ni-Sepharose カラムに供し、吸着した目的タンパク質をイミダゾールで溶出した。透析後、限外ろ過膜で濃縮し、50%グリセロールを等量混合して -20 $^{\circ}$ C で保存した。タンパク質濃度は BSA を標準としてブラッドフォード法で測定した。

## ③酵素活性測定

パント酸キナーゼ活性の反応液は 10mM D-パント酸、10mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM 2-メルカプトエタノール、50mM Tris-HCl (pH7.5)、および酵素液から構成され (全容 100 $\mu$ l)、30 $^{\circ}$ C で 16 時間の反応後、氷上に移すことにより反応を停止した。生成したホスホパント酸は HPLC で解析した。

ホスホパント酸シンテターゼ活性測定の反応系は、前記パント酸キナーゼ反応を 48 時間行った反応液から限外ろ過膜で PoK を除去し、 $\beta$ -アラニン (終濃度 10mM) を添加して調製した。反応は PPS の添加により開始され、生成した 4'-ホスホパント酸を HPLC で解析した。

HPLC による解析には陰イオン交換カラム (TSKgel DEAE-5PW) を使い、Buffer A と Buffer B を用いたグラジエント法を採用し、205nm で検出した。Buffer A は 20mM Tris-HCl (pH8.0)、Buffer B は 0.5M NaCl を含む 20mM Tris-HCl (pH8.0) で構成されており、溶出は 0-10 分が Buffer A:Buffer B = 90:10 で、次いで 10-30 分の 20 分間で Buffer A:Buffer B = 60:40 なるようにグラジエントを掛けた。

## (2) *Bacillus subtilis* が有する 2 つの *CoaA* ホモログ、原核 I 型 *CoaA* (*BsCoaA*) および原核 III 型 *CoaA* (*BsCoaX*) の *CoA* 生合成経路での役割

### ① *BsCoaA* および *BsCoaX* の発現と精製

*B. subtilis* 由来 *BsCoaA* (*BsCoaA* [gi 50812263]) および *BsCoaX* (gi 255767018) の発現プラスミドは *BsCoaA* 遺伝子および *BsCoaX* 遺伝子を PCR で増幅し、pET-28a(+) の T7 プロモーターの下流に連結して、発現プラスミド、pET-*Bs-coaA* および pET-*Bs-coaX* をそれぞれ作製した。pET-*Bs-coaA* あるいは pET-*Bs-coaX* を保持する *E. coli* BL21(DE3) を抗生物質を含む LB 培地で 30 $^{\circ}$ C で振とう培養し、IPTG の添加により目的タンパク質を誘導した。遠心集菌後、0.5M NaCl を含む 20mM Tris-HCl (pH7.9) に懸濁し、氷上で超音波破碎した。遠心分離で得られた上清を Ni-Sepharose カラムに供し、吸着した組換え His-tag タンパク質をイミダゾールで溶出した。透析後、限外ろ過膜で濃縮し、50%グリセロールを等量混合して -20 $^{\circ}$ C で保存した。タンパク質濃度は BSA を標準としてブラッドフォード法で測定した。

### ② パント酸キナーゼ活性

*Bs*CoaAの酵素活性の反応液は 91 $\mu$ M D-[<sup>14</sup>C]パントテン酸、2.5mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.3)、および酵素液から構成され (全容 40 $\mu$ l)、30 $^{\circ}$ Cで 10 分間の反応の後、4 $\mu$ lの酢酸を添加することにより反応を停止した。*Bs*CoaXの活性測定にはリン酸カリウム緩衝液 (pH5.5) を用い、さらに 60mM NH<sub>4</sub>Clを添加して行った。反応液を Whatman DE81 ディスクに乗せ、1% 酢酸を含む 95% エタノールで洗浄後、ディスク上の生成した 4'-ホスホパントテン酸の放射活性を 3mlのScintiSafe 30%中で測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 古細菌由来パント酸キナーゼ (PoK) およびホスホパントテン酸シンターゼ (PPS) の解析

① *Methanospirillum hungatei* 由来遺伝子による *E.coli* ts9 株の生育相補試験

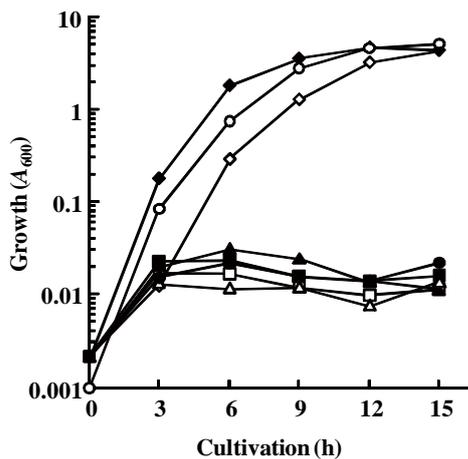


図2. Mhun\_0830およびMhun\_0832による*E.coli* ts9株の生育相補試験。

▲, pUC-Mhun\_0830; △, pUC-Mhun\_0831;  
■, pUC-Mhun\_0832; □, pUC-Mhun\_0830-0831;  
◆, pUCMhun\_0831-0832;  
◇, pUCMhun\_0830-0831-0832;  
●, pUC118; ○, pUC-*Ec*CoaA.

pUC118 で作成した Mhun\_0830、Mhun\_0831、および Mhun\_0832 の発現プラスミドを用いて、*E.coli* ts9 株の 37 $^{\circ}$ Cでの生育を試験した。図 2 に示すように、Mhun\_0831 と Mhun\_0832 を同時に持つ菌株だけ、37 $^{\circ}$ Cでの生育が可能であった。このことは、Mhun\_0831 と Mhun\_0832 が共同して 4'-ホスホパントテン酸を供給していることを示している。

② Mhun\_0831 および Mhun\_0832 の機能

Mhun\_0831 および Mhun\_0832 の機能を解析するため、電気泳動的に均一に精製した組換え酵素を調製した (図 3)。

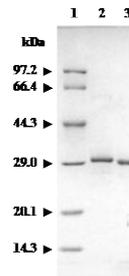


図3. 組換えMhun\_0831 (lane 2) およびMhun\_0832 (lane 3) のSDS-PAGE.

組換え酵素の活性を解析した結果を図 4 に示した。反応 0 時間は Mhun\_0831 の反応液を示しており、ホスホパント酸のピークが観察される。次いで、Mhun\_0831 の反応液から限外ろ過膜で Mhun\_0831 を除去し、新たに  $\beta$ -アラニンと Mhun\_0832 を添加して反応を開始した。反応 2 時間で 4'-ホスホパントテン酸のピークが観察され、4 時間、6 時間、16 時間と時間の経過とともに増大した。したがって、Mhun\_0831 はパント酸キナーゼ (PoK)、そして Mhun\_0832 はホスホパントテン酸シンターゼと同定された。本解析結果は超好熱菌で報告された結果と一致しているため、古細菌は COG1829 に属する PoK を用いてパント酸をリン酸化し、COG1701 に属する PPS が生成したホスホパント酸と  $\beta$ -アラニンを縮合することにより、4'-ホスホパントテン酸を CoA 生合成経路に供給していることが明らかとなった。

③ CoA およびアシル-CoA が PoK および PPS 活性に及ぼす影響

表 1. CoA および acyl-CoA が PoK 活性および PPS 活性に及ぼす影響

Compound	PoK	PPS
CoA	102 $\pm$ 4.95	312 $\pm$ 22.5
Acetyl-CoA	104 $\pm$ 2.55	164 $\pm$ 24.1
Malonyl-CoA	83.2 $\pm$ 3.35	136 $\pm$ 10.6

CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA を 200 $\mu$ M 添加し、PoK および PPS 活性を測定した (表 1)。PoK 活性は最終生産物に対して感受性を示さなかったが、PPS は CoA で 3.12 倍、アセチル-CoA で 1.64 倍、マロニル-CoA で 1.36 倍に活性化された。PoK は CoA による調節を受けないが、次の縮合反応は CoA によって正の調節を受けているようである。

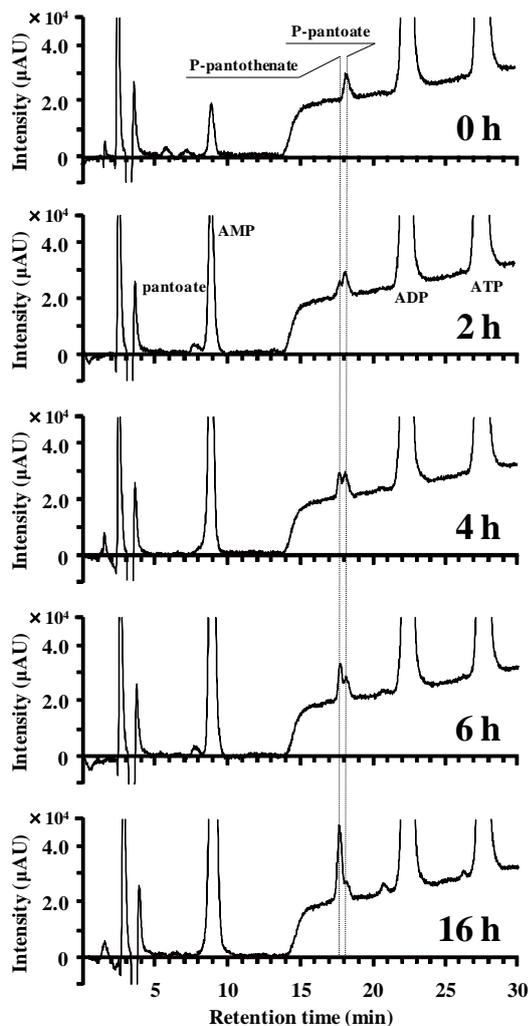


図4. Mhun\_0831およびMhun\_0832の機能同定.

【0h】Mhun\_0831で48時間反応させた反応液. Mhun\_0831で48時間反応させた反応液にMhun\_0832とβ-アラニンを添加し、2時間後【2h】、4時間後【4h】、6時間後【6h】、および16時間後【16h】の反応生成物をHPLCで解析した.

(2) *B.subtilis* が有する2つのCoaAホモログ、原核I型CoaA (*BsCoaA*) および原核III型CoaA (*BsCoaX*) のCoA生合成経路での役割

生物の中にはゲノムDNA上にCoaAホモログ遺伝子を2つ持つ生物が存在する。例えば、*Mycobacterium tuberculosis* は原核I型とIII型、*B.anthraxis* は原核II型とIII型、*B.subtilis* は原核I型とIII型を持っている。複数のCoaAがある場合、どちらが機能しているのか、どちらも機能している場合はどちらのCoaAが優位に機能しているかによって細胞内のCoA調節

機構は大きく変わってくる。これまでに、*M.tuberculosis*の原核III型CoaAホモログには酵素活性がなく、原核I型CoaAのみが機能していること、同様に*B.anthraxis*の原核II型CoaAホモログには酵素活性がなく、原核III型CoaAのみが機能していることが報告されている。そこで、本研究課題では*B.subtilis*の原核I型およびIII型CoaAの機能について解析した。

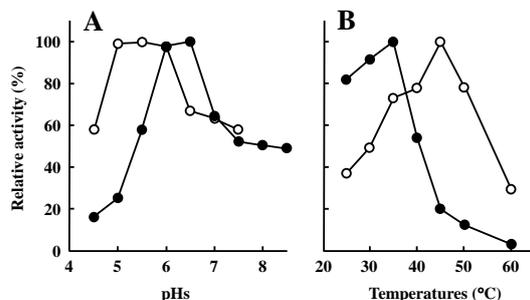


図5. *BsCoaA*および*BsCoaX*の至適pH (A) および至適温度 (B). ●, *BsCoaA*; ○, *BsCoaX*.

*BsCoaA* および *BsCoaX* 機能を解析するため、電気泳動的に均一に精製した組換え酵素を調製した。*B.subtilis*では両酵素ともCoaA活性を示した。*BsCoaA*の至適pHは6.5、至適温度は35°Cであった(図5)。一方、*BsCoaX*の至適pHは5.5、至適温度は45°Cであった。両酵素とも中性付近、生育温度の30°C付近で十分活性を示したので、生理的条件下でも機能することができると考えられた。

表2.ヌクレオチド特異性

Phosphate donor <sup>d</sup>	Relative activity (%)			
	<i>BsCoaA</i>	<i>BsCoaX</i>	<i>EcCoaA</i> <sup>e</sup>	<i>PtCoaA</i> <sup>e</sup>
ATP	100	100	100	100
GTP	283	134	40.1	81.0
CTP	27.6	15.4	4.2	68.0
UTP	206	46.9	19.6	91.8

<sup>d</sup> 各ヌクレオチドを終濃度が1mMになるように添加した。

<sup>e</sup> "J. Bacteriol., 192:233-241, 2010"から引用。

次いで、パントテン酸キナーゼのリン酸供与体としてのヌクレオチド特異性を試験した(表2)。*BsCoaA*および*BsCoaX*ともGTPに対する活性が最も高く、*BsCoaA*に関してはUTPでもATPのおよそ2倍の活性を示した。*BsCoaA*は原核I型CoaAに属するが、*E.coli*および*P.torridus*由来の原核I型CoaAと比較すると、真正細菌由来の*EcCoaA*ほど厳密ではなく、むしろ古細菌由来*PtCoaA*に似てヌクレオチド三リン酸を幅広く受け入れた。

*BsCoaA*および*BsCoaX*とも酵素活性を有していた。これまで、2つのCoaAホモログを有している微生物として、*M.tuberculosis*および*B.anthraxis*の解析が終了しているが、

いずれも片方の CoaA にのみ酵素活性が確認されており、生体ではいずれか一方のみが機能していることが報告されている。しかしながら、今回解析した *B.subtilis* では、両ホモログから酵素活性が検出され、生体内で 2 つの CoaA が機能している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hiroki Katoh, Hideyuki Tanaki, Yuka Tokutake, Satoshi Hanada, Shigeru Chohnan, 『 Identification of pantoate kinase and phosphopantoate synthetase from *Methanospirillum hungatei* 』 , Journal of Bioscience and Bioengineering, 115 巻 , 372-376, 2013, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.10.019, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 緒形雄太、朝山宗彦、長南茂、『枯草菌のコエンザイムA生合成』、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.26、東北大学
- ② Yuta Ogata, Yuka Tokutake, Shigeru Chohnan, 『 Characterization of prokaryotic types I and III pantothenate kinases from *Bacillus subtilis* 』 , 112th General Meeting, American Society for Microbiology, 2012.6.19, Moscone Convention Center at San Francisco (アメリカ)
- ③ 緒形雄太、長南茂、『枯草菌の原核 I 型および III 型パントテン酸キナーゼの性質』、第 27 回日本微生物生態学会大会、2011.10.9、京都大学
- ④ Hiroki Katoh, Hideyuki Tamaki, Yuka Tokutake, Satoshi Hanada, Shigeru Chohnan, 『 A coenzyme A biosynthetic pathway in archaea 』 , 111th General Meeting, American Society for Microbiology, 2011.5.24, Ernest N. Morial Convention Center at New Orleans (アメリカ)
- ⑤ 加藤広己、長南茂、『メタン生成古細菌のコエンザイムA生合成経路』、日本微生物生態学会第 26 回大会、2010.11.25、筑波大学
- ⑥ Masakazu Takagi, Yukiko Miyamoto, Hideyuki Tamaki, Roberta Leonardi, Satoshi Hanada, Suzanne Jackowski, Shigeru Chohnan, 『 Pantothenate kinase from thermoacidophilic archaeon 』 , 110th General Meeting, American Society for Microbiology, 2010.5.24, San Diego

Convention Center (アメリカ)

[その他]

ホームページアドレス

<http://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/5/0000444/profile.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

長南 茂 (CHOHNAN Shigeru)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：70312775