

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580137

研究課題名(和文)ロイシンの生体調節因子としての機能の解明とその構造生物学的研究

研究課題名(英文)Functional analysis and molecular basis of leucine as a biological regulator

研究代表者

富田 武郎 (Tomita, Takeo)

東京大学・生物生産工学研究センター・助教

研究者番号：50447364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸センサーであることが予想された好熱菌 *Thermus thermophilus* の SraA と相互作用するタンパク質を探索した結果、トリプトファン生合成経路の酵素 TrpD が同定された。生化学的解析の結果、SraA が生合成の最終産物であるトリプトファンを感知し、TrpD にそのシグナルを伝え、活性阻害を行うという新規なフィードバック阻害が存在することが明らかになった。また、ロイシンによってアロステリック調節を受けるグルタミン酸脱水素酵素とプリン生合成経路酵素のホモログが相互作用することを見出し、新規な代謝調節機構が存在する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Molecular partner of SraA, which was supposed to be a sensor of amino acid, was searched and we identified TrpD, a second enzyme on biosynthesis of tryptophan. We performed biochemical analyses and suggested that SraA sensed tryptophan, which was an end product of the biosynthetic pathway, and transmitted the signal toward TrpD to inhibit the activity. This is a novel mechanism for feedback inhibition of tryptophan biosynthetic pathway. We also found GDH interacted with a homolog of enzyme involved in purine biosynthetic pathway and indicated existence of a novel regulatory mechanism of intracellular metabolism.

研究分野：構造生物学

キーワード：ロイシン 生体調節因子 好熱菌 グルタミン酸脱水素酵素 シグナル伝達 アロステリック調節 グローバル調節 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

分岐鎖アミノ酸を始めとしたアミノ酸は近年生体調節因子として注目を集めている。ヒトではアミノ酸の調節因子としての機能のひとつとしてロイシンによる GDH のアロステリックな活性化を介したインスリン分泌や、シグナル伝達因子 mTOR(mammalian Target of Rapamycin)を介したロイシンによるタンパク質合成の促進などの機構が明らかにされつつある。しかし、それに関与する因子の数は多く、制御ネットワークも複雑であると考えられることから、その詳細な分子機構の全貌を解明するためには更なる精力的な研究とブレークスルーを要するものと考えられていた。

一方、植物やバクテリアにおいてもアミノ酸がそれ自身の代謝調節のみならず細胞機能全体の調節因子として機能する報告があり、アミノ酸に対する細胞応答機構を解明することは、代謝工学的応用への基盤を提示するものと期待された。私は、これまでに高温発酵としての潜在性を有する高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において炭素-窒素代謝の中核を担うグルタミン酸脱水素酵素がバクテリアとしては初めてロイシンによるアロステリック活性化を受けることを見出し、さらに結晶構造解析により調節の構造基盤を明らかにしてきた。また、DNA マイクロアレイを用いた網羅的転写解析から、ロイシンは *T. thermophilus* のゲノム上に存在する多数の遺伝子の発現量の変動を引き起こすことを示した。しかしながら、好熱菌においてロイシンを始めとしたアミノ酸に対する応答機構に関する詳細な解析はなされておらず、ロイシンの生体調節因子としての役割は未解明なのが現状であった。

2. 研究の目的

我々は始原生物としてのモデル生物の一種である好熱菌 *Thermus thermophilus* において炭素-窒素代謝の中核を担うグルタミン酸脱水素酵素がバクテリアとしては初めてロイシンによる活性化を受けることを見出し、結晶構造解析によりその構造基盤を明らかにしてきた。本課題では、*T. thermophilus* においてロイシンをシグナルとした未知の細胞機能機構が存在することを予想し、その発見と分子機構の解析を行うことを目指した。*T. thermophilus* はゲノムサイズが約 2 Mb 程度と非常に小さいものの生命としての基本装置を備えていることから、その代謝活

動の根幹となるシステムの分子機構を明らかにすることによって全生物に普遍的に存在する生命現象を明らかにできることが期待される。

3. 研究の方法

(1) *T. thermophilus* におけるロイシンによるシグナル伝達機構の解析

T. thermophilus の組換え株を利用したブルダウンアッセイ・相互作用タンパク質の同定

SraA の N 末端に Strep タグが融合するよう設計したプラスミドを用いて *T. thermophilus* を形質転換した。組換え株を薬剤によって選択し、栄養培地に植菌、培養した。菌体を集菌後、Strep-tactin カラムにアプライし、洗浄の後、目的タンパク質を溶出させた。溶出各分を濃縮後、SDS-PAGE にて分離し、目的タンパク質をゲルから切り出し、MS 解析を行った。

SraA/TrpD の機能・構造解析

SraA と TrpD の間の相互作用を解析するために、両者を共発現させるよう設計したプラスミドを用いて大腸菌 BL21 RILCodonPlus(DE3) 株を形質転換し、培養、IPTG によるタンパク質発現誘導を行った。集菌、ソニケーション、遠心の後、熱処理を行い、Ni²⁺アフィニティーカラムを用いた精製を行った。精製画分を濃縮しゲルろ過カラムに供した。アミノ酸添加の条件においては大腸菌の集菌時のバッファーから最後まで 1 mM のアミノ酸を添加し続け、精製を行った。

TrpD の活性測定はピロリン酸試薬を用いて行った。アントラニル酸と PRPP, MgSO₄ と HEPES-NaOH バッファー、ピロリン酸試薬を混合した溶液を 30 度でインキュベートした後、適量の酵素を添加することで反応を開始した。反応は試薬に含まれる NADH が NAD⁺ に変化することによる 340 nm の吸収の減少をモニターすることで測定した。反応系にトリプトファン、SraA を添加することによる影響を観察した。

SraA や TrpD, SraA/TrpD の会合状態はゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより解析した。熱処理、Ni²⁺カラムにより精製したタンパク質をゲルろ過カラムに供し、溶出させ、マーカータンパク質との溶出体積を比較することによって分子量を測定した。アミノ酸添加条件においてはサンプルに 1 mM アミノ酸を添加するのに加え、溶出バッファーにも 1 mM のアミノ酸を加えた。分画したフラクションを SDS-PAGE 分析することによってそこ

に含まれるタンパク質の種類を同定した。

SraA の結晶構造解析

10 mg/ml 程度の濃度まで濃縮した SraA を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。市販のキットを用いて数百条件以上の条件検討を行った。また、500 μ M トリプトファン添加条件で精製した SraA についても同様のスクリーニングを行った。

(2) グルタミン酸脱水素酵素のアミノ酸によるアロステリック調節機構の解析

T. thermophilus の組換え株を利用したブルダウンアッセイ・相互作用タンパク質の同定

GdhA の N 末端に Strep タグが融合するように設計したプラスミドを用いて *T. thermophilus* を形質転換した。組換え株を薬剤によって選択し、栄養培地に植菌、培養した。菌体を集菌後、Ni²⁺レジンカラムにアプライし、洗浄の後、目的タンパク質を溶出させた。溶出各分を濃縮後、SDS-PAGE にて分離し、目的タンパク質をゲルから切り出し、MS 解析を行った。

APRT の機能・構造解析

GdhA と APRT の間の相互作用を解析するために、両者を共発現させるよう設計したプラスミドを用いて大腸菌 BL21 RILCodonPlus(DE3) 株を形質転換し、培養、IPTG によるタンパク質発現誘導を行った。集菌、ソニケーション、遠心の後、熱処理を行い、Ni²⁺アフィニティークラムを用いた精製を行った。精製画分を濃縮しゲルろ過カラムに供した。

APRT の活性測定はピロリン酸試薬を用いて行ったプリン塩基と PRPP, MgSO₄ と HEPES-NaOH バッファー、ピロリン酸試薬を混合した溶液を 30 度でインキュベートした後、適量の酵素を添加することで反応を開始した。反応は試薬に含まれる NADH が NAD⁺ に変化することによる 340 nm の吸収の減少をモニターすることで測定した。

APRT を 80 mg/ml 程度の高濃度まで濃縮し、吸収スペクトルを測定した。標準物質としてフラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチドの吸収スペクトルを測定した。

APRT の結晶構造解析

10 mg/ml 程度の濃度まで濃縮した APRT を用いて結晶化条件のスクリーニングを行っ

た。市販のキットを用いて数百条件以上の条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) *T. thermophilus* におけるロイシンによるシグナル伝達機構の解析

(1) Stand-alone RAM ドメインタンパク質 SraA の解析

これまでの我々の研究により *T. thermophilus* の GDH が代謝経路上直接関連のないロイシンによってアロステリック調節を受けることが明らかになった。このことから、GDH は新規なロイシンのセンシング機構として利用されていることが示唆された。一方、大腸菌などでは LRP (Leucine-responsive regulatory protein) がロイシンを感知し、下流の遺伝子の調節を行う転写調節因子であることが知られている。LRP は N 末端側に存在する DNA 結合ドメインと C 末端側のアミノ酸結合ドメインである RAM ドメインからなる。多くのバクテリア、古細菌はそのゲノム上に複数の LRP ホモログを有しており、それぞれアミノ酸等のシグナルを伝達する転写調節因子として機能している。興味深いことに *T. thermophilus* のゲノム上には LRP ホモログは存在せず、その代わりに RAM ドメインのみからなるタンパク質である SraA を 1 つだけ有している。SraA はアミノ酸を感知し、そのシグナルを別のタンパク質へと伝達することが予想されたことから、タグの融合した SraA を高発現するような *T. thermophilus* の組換え株を作製し、ブルダウンアッセイを行ったところ、相互作用すると考えられる幾つかのタンパク質が検出された。さらに、MS 解析を行った結果、主要なものとして TrpD が同定された。TrpD はトリプトファン生合成経路の 2 番目の酵素である。大腸菌を用い TrpD と SraA を共発現させ、精製した結果、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーにおいてこれらが共精製されたことから、両者が相互作用していることが確認された。さらにゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、両者は容易に解離することが示された。生合成経路の最終産物であるトリプトファン存在下でのゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、両者が強固なヘテロ複合体を形成することが示された。TrpD の活性測定を行った結果、トリプトファン非存在下では反応系に SraA を添加してもほとんど活性阻害が見られなかったのに対し、トリプトファン存在下では SraA 添加量の上昇とともに最大 50% 程度まで活性阻害が観察された。以上の結果

から、SraA がトリプトファンを結合し、TrpD にそのシグナルを伝えることによってフィードバック阻害を仲介しているというモデルが提示された。トリプトファン合成の調節としてはアテニュエーションによる転写抑制機構、TrpR による転写調節機構、TrpEG のフィードバック阻害機構が知られているのみであり、今回発見された SraA を介するシステムは新規なフィードバック阻害機構であるといえる。

研究の過程で SraA は単体では 2 量体と 10 量体の平衡状態で存在し、トリプトファンの添加により 10 量体形成が誘導されることが示されている。興味深いことにロイシン等の別のアミノ酸もその会合状態に影響を与えることが示された。一方、プルダウンアッセイの結果 TrpD 以外にもリボソームを構成するタンパク質や分子シャペロン、機能未知タンパク質が相互作用することが示されており、アミノ酸添加条件で新たに見出されるタンパク質も存在することがわかっている。このことから SraA は TrpD 以外の多数の分子ターゲットが存在し、アミノ酸をシグナルとしたグローバル調節因子として機能している可能性が示唆された。

(2) グルタミン酸脱水素酵素のアミノ酸によるアロステリック調節機構の解析

(1) グルタミン酸脱水素酵素と相互作用するタンパク質の解析

これまでに我々は GDH が GdhA と GdhB からなるヘテロ 6 量体構造を有することが明らかにしてきた。一方、GdhA 単体の結晶構造解析の結果、GdhA はホモ 4 量体構造をとっていることが明らかになっている。この 4 量体は通常の 2 量体単位のヌクレオチド結合ドメイン同士が相互作用するといった新規な会合様式を有していた。このことから GdhA 単体では別の機能を有する可能性が示唆された。そこで、タグを融合した GdhA を高発現する *T. thermophilus* の組換え株を作製し、プルダウンアッセイを行った結果、相互作用するタンパク質が検出された。MS 解析の結果アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ APRT と同定された。APRT はプリン塩基のサルベージ経路の酵素であり、プリン塩基と PRPP を結合させ、プリンモノヌクレオチドを生成する酵素である。この APRT ホモログの活性測定を行った結果アデニンを始めとしたプリン塩基を基質とした活性は検出されなかった。一方、大腸菌において大量発現させ、精製した APRT はうすい黄色を呈してお

り、その吸収スペクトルからフラビン化合物を結合していることが示唆されている。以上の結果から GDH と APRT の相互作用を介した新規な細胞内代謝調節機構が存在する可能性が示唆されている。

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 0 件)

[学会発表](計 11 件)

富田武郎、西山真 *Thermus thermophilus* 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼホモログの構造・機能解析 日本農芸化学会 2015 年度大会(岡山) 2015 年 3 月 29 日

久保田哲央、松下創、富田武郎、葛山智久、西山真 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるアミノ酸シグナル応答機構の解析 日本農芸化学会 2015 年度大会(岡山) 2015 年 3 月 29 日

Takeo Tomita, Shugo Nakamura, Makoto Nishiyama Crystal structure and insight into extremely high glutamate production activity of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* (富山) 2014 年 12 月 17-19 日

久保田哲央、松下創、富田武郎、葛山智久、西山真 高度好熱菌におけるアミノ酸シグナル伝達機構の解析 第 4 回モデル生物丸ごと一匹学会 (大阪) 2014 年 9 月 26-27 日

Takeo Tomita, Makoto Nishiyama The first reaction intermediate complex of glutamate dehydrogenase ASBMB annual meeting (San Diego, USA) 2014 年 4 月 26-30 日

久保田哲央、松下創、富田武郎、葛山智久、西山真 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるアミノ酸シグナル応答機構の解析 日本農芸化学会関東支部会 2013 年度支部大会(横浜) 2013 年 11 月 22 日

Takeo Tomita The first reaction intermediate complex of glutamate

dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* Enzyme EngineeringXXII(富山)
2013 年 9 月 22-26 日

Takeo Tomita, Makoto Nishiyama First reaction intermediate complex of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* International conference on structural genomics 2013 (札幌) 2013 年 7 月 29 日から 8 月 1 日

富田武郎、インルル、葛山智久、西山真 *Corynebacterium glutamicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素の結晶構造解析 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台) 2013 年 3 月 25 日

松下創、富田武郎、葛山智久、西山真 LysR ファミリー転写制御因子 TTC1871 の機能解析 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台) 2013 年 3 月 26 日

松下創、富田武郎、葛山智久、西山真 Functional analysis of TTC1871 LysR-type transcriptional regulator 第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会 (兵庫) 2012 年 9 月 28-29 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 武郎 (Tomita Takeo)
東京大学・生物生産工学研究センター・助教

研究者番号：50447364

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：