

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2009
 課題番号： 19580079
 研究課題名 (和文) パントテン酸キナーゼによる古細菌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 Archaea
 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) : 好熱好酸性古細菌由来コエンザイム A 生合成経路の鍵酵素であるパントテン酸キナーゼ遺伝子 (*coaA*) の同定に成功した。本酵素は大腸菌に代表される原核 I 型 CoaA に属するが、原核 I 型 CoaA の最も特徴的な性質である CoA による最終生産物阻害を受けなかった。したがって、本酵素が分布する *Thermoplasmatales* 目古細菌の CoA 生合成経路は CoaA では調節されていないことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : A gene encoding a pantothenate kinase (CoaA) which is a key enzyme in coenzyme A biosynthetic pathway has been identified in a thermoacidophilic archaeon. The archaeal CoaA belongs to a prokaryotic type I CoaA and is not governed by feedback inhibition by CoA and its thioesters, although prokaryotic type I CoaAs are generally inhibited by the CoA species. Therefore, CoA biosynthetic pathways in the archaea belonging to the order *Thermoplasmatales* which has the type I CoaA are not regulated at CoaA step.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009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、古細菌、コエンザイム A

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム A (CoA) はビタミン B₅ 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

合であるチオエステル結合を形成する。これら化合物は一般にアシル-CoA (CoA チオエステル) と呼ばれ、生体内代謝ではアシル基のキャリアー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であり、全酵素の4%がアシル-CoA、CoA、あるいはCoAの構成分子である4'-ホスホパンテテインを基質として利用している。このことはCoAが生物の発達過程の非常に早い時期に既に存在していたことを示唆している。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生合成系は、パントテン酸キナーゼ(原核生物ではCoaA、真核生物ではPanK)、4'-ホスホパントテノイルシステインシンターゼ(CoaB)、4'-ホスホパントテノイルシステインデカルボキシラーゼ(CoaC)、ホスホパンテテイン アデニルトランスフェラーゼ(CoaD)、およびデホスホ-CoAキナーゼ(CoaE)の5つの酵素から構成されている。これら5種の既知酵素のアミノ酸配列を利用して比較ゲノム解析をしてみると、多くの生物でオルソログ遺伝子を見つけたことができる。CoaB、CoaC、CoaD、およびCoaEは大腸菌、あるいは真核生物型のオルソログとして、生物の3つのドメイン、すなわち真正細菌、古細菌、および真核生物のゲノムDNAに広く観察される。一方、CoA生合成系の鍵酵素であるCoaAは、アミノ酸配列を基に、真正細菌で3種、真核生物で1種の計4種に分類され、CoA生合成系で唯一多様性を示す酵素タンパク質となっている。大腸菌由来CoaAに代表される原核I型CoaAは最も良く研究されており、CoAあるいはアシル-CoAで最終生産物阻害を受け、これにより細胞内CoAおよびアシル-CoA量は厳密に調節されている。スタフィロコッカス属細菌由来CoaAが属する原核II型CoaAおよび緑膿菌由来CoaAが属する原核III型CoaAは最終生産物であるCoAおよびアシル-CoAに対してまったく感受性を示さないという性質を有している。真核生物のPanKには各アミノ酸配列間に相関性があり、最終生産物のCoAあるいはアシル-CoAで正あるいは負の調節を受ける。

このようにCoA生合成系の主たる調節ステップであるパントテン酸キナーゼ(CoaAおよびPanK)は細胞内CoAレベルの調節機構を考察する上で重要であり、真正細菌および真核生物では既に同定されているが、古細菌由来CoaAは未だに一つも発見されておらず、行方不明遺伝子として取り残されていた。

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、本申請では古細菌に焦点をあて、好熱好酸性古細菌

*Picrophilus torridus*を材料とし、CoaA遺伝子の同定および酵素学的諸性質の解析を行うことにより、古細菌のCoA生合成経路の調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 古細菌ゲノムDNA上でのパントテン酸キナーゼ遺伝子の探索

パントテン酸キナーゼ(CoaAまたはPanK)のホモロジー検索にはNational Center for Biotechnology Information (NCBI)のBLASTプログラムを用いた。得られた遺伝子配列およびアミノ酸配列の解析にはGENETYXソフトウェアおよびClustalWを使用した。既知CoaAおよびPanKのアミノ酸配列には以下の5つを使用した:*Escherichia coli*由来CoaA(原核I型CoaA)、*Staphylococcus aureus*由来CoaA(原核II型CoaA)、*Pseudomonas aeruginosa*由来CoaA(原核III型CoaA)、*Aspergillus nidulans*由来PanK(真核型)、およびマウス由来PanK I α (真核型)。

系統解析にはNJ法とML法を用い、72の真正細菌由来原核I型CoaAおよび*E. coli*由来ウリジンキナーゼの計73種のアミノ酸配列を用いて解析した。

(2) 発現プラスミドの構築

好熱好酸性古細菌*P. torridus*由来PT00232遺伝子を菌体を鋳型としてPCRで増幅し、pMD20-TベクターにTAクローニング後、pMD-PT00232を得た。挿入断片の遺伝子配列を確認後、NdeIおよびSalIでPT00232を切り出し、pET-28a(+)⁺のT7プロモーターの下流に連結し、*E. coli*での発現プラスミドpET-PT00232を構築した。また、*E. coli*のCoaA温度感受性変異株を用いた生育相試験を行うため、pMD-PT00232からPT00232遺伝子を含むKpnI-HindIII断片を切り出し、pUC118のlacプロモーターの下流に連結し、pUC-PT00232を得た。

(3) 古細菌由来CoaAの発現と精製

pET-PT00232を保持する*E. coli* BL21(DE3)-GTを抗生物質を含む2LのLB培地で30°Cで振とう培養し、A600が0.5に達したら、終濃度が0.1mMになるようにIPTGを添加し、さらに6時間培養した。形質転換の宿主として使用した*E. coli*はpET-PT00232の他、シャペロンの発現プラスミド(pG-Tf2)および希少コドンに対応するtRNAをコードするpSC101-basedプラスミドを保持し、酵素の発現およびフォールディングを補助する性質を有している。遠心集菌後、1.5M NaCl、1 mg/ml リゾチーム、10 μ g/ml DNase I、および0.1% Triton X-100を含む20mM Tris-HCl (pH7.9)に懸濁し、凍結融解で細胞を破壊し

た。遠心で細胞破片を除去後、Ni-Sepharose カラムに供し、組換え His-tag PT00232 を吸着させ、500mM イミダゾールの直線濃度勾配で目的タンパク質を溶出させた。活性画分を回収し、透析で組換えタンパク質を沈殿させ、沈殿を 1.5ml の 500mM 硫酸アンモニウム、1mM 2-メルカプトエタノール、および 50%グリセロールに溶解し、-20°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。

(4) パントテン酸キナーゼ活性測定

パントテン酸キナーゼ活性の反応系は 91μM D-[¹⁴C]パントテン酸、2.5mM ATP、10mM MgCl₂、50mM 酢酸ナトリウム (pH5.2)、酵素液から構成され (全容 40μl)、55°Cで10分間の反応の後、4μl の酢酸を添加することにより反応を停止した。反応液は 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 4'-ホスホパントテン酸を 3ml の ScintiSafe 30%中で放射活性を測定した。

(5) 古細菌 *coaA* による *E. coli* ts9 株の生育相補試験

PT00232 のパントテン酸キナーゼとしての機能を同定するために、pUC-PT00232 を *E. coli* ts9 株に形質転換した。50μg/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地に形質転換体を塗布し、30°Cおよび 37°Cで一晩培養した。

4. 研究成果

(1) 古細菌由来パントテン酸キナーゼ遺伝子の探索

E. coli 由来 CoaA、*S. aureus* 由来 CoaA、*P. aeruginosa* 由来 CoaA、*A. nidulans* 由来 PanK、およびマウス由来 PanK I α のアミノ酸配列を用いて、古細菌由来ゲノム DNA 上を BLAST 検索した結果、古細菌由来 CoaA の候補遺伝子として、*Ferroplasma acidarmus* fer1 由来 Faci_03001718、*P. torridus* 由来 PT00232、および *Thermoplasma valcanium* GSS1 由来 TVN0137 が候補として検出された (図 1)。い

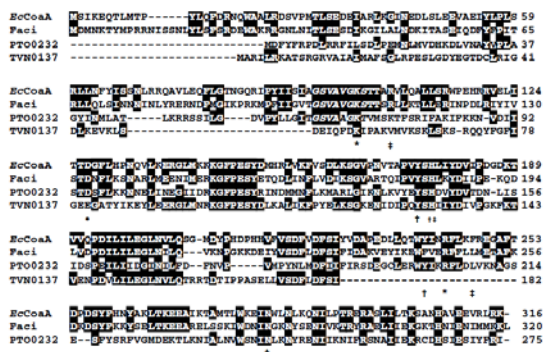


図 1. アミノ酸配列の比較

ずれも *E. coli* 由来原核 I 型 CoaA に相同性を示し、アミノ酸レベルで 42%、28%、および 41%一致する。さらに前者 2 つは典型的な ATP 結合モチーフを有し、*E. coli* 由来 CoaA で明らかにされた活性中心を保存していた。しかしながら、*T. valcanium* 由来 TVN0137 は *E. coli* 由来 CoaA より 134 アミノ酸短く、明確な ATP 結合モチーフおよび活性中心を保存していなかった。したがって、これらの解析で少なくとも *F. acidarmus* 由来 Faci_03001718 および *P. torridus* 由来 PT00232 は原核 I 型 CoaA に属する古細菌由来 CoaA の候補であることが示唆された。

原核 I 型 CoaA の系統樹を作製すると、適度に網あるいは門レベルで分類される (図 2)。

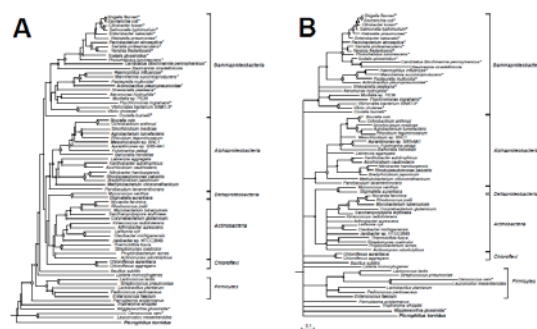


図 2. 原核 I 型 CoaA の系統樹 (A)NJ 法, (B)ML 法

しかしながら、古細菌由来 2 つの CoaA はグループ化されず、また系統樹の深い位置にあるため、他の原核 I 型 CoaA とは離れていることが確認された。

(2) *P. torridus* 由来パントテン酸キナーゼ遺伝子のクローニングと発現

P. torridus の菌体を鋳型にして PT00232 遺伝子を PCR で増幅し、発現プラスミド pUC-PT00232 および pET-PT00232 を構築した。まず、パントテン酸キナーゼとしての PT00232 の機能を *E. coli* ts9 株で確かめた。CoaA 遺伝子に変異を持つ ts9 株は 37°Cではほとんど生育しないが、*lac* プロモーターの下流に PT00232 を持つ pUC-PT00232 を形質転換すると、ts9 株の 37°Cでの生育は相補された (図 3)。PT00232 はパントテン酸キナーゼ活性を有していることが確認されたので、次に pET-PT00232 を用いて PT00232 を *E. coli* で発現させた。フォールディングを助けるためのシャペロンおよび宿主である *E. coli* の希少コドンを補うための tRNA を保持するプラスミドを共発現することにより、目的タンパク質の一部を可溶性画分に回収することに成功した (図 4A, lane 4)。可溶性画分の組換え PT00232 は Ni-Sepharose カラムクロマトグラフィーおよび透析で電気泳動的にほぼ均一に精製された (図 4B, lane 2)。組

換え酵素はグロブリンで透析処理で沈殿し

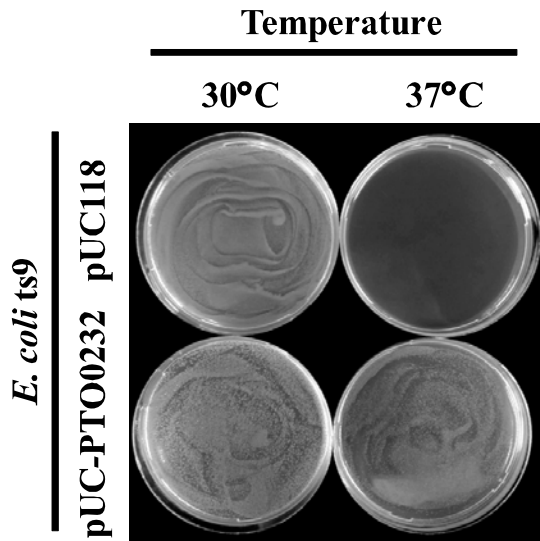


図3. *E. coli* ts9 株の生育相補

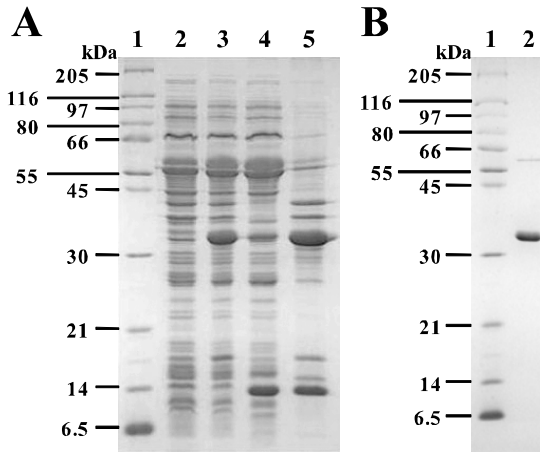


図4. 組換え PT00232 の SDS-PAGE

(A) *E. coli* で発現させた PT00232, (B) 精製 PT00232

た。生じた沈殿は 500mM 硫酸アンモニウム、1mM 2-メルカプトエタノール、および 50% グリセロールを含む 25mM Tris-HCl (pH7.6) に溶解され、-20°C で保存された。一連のステップで最終精製酵素標品の比活性は 360 nmol/min/mg になり、27.3 倍に精製され、活性の回収率は 22.3% であった(表1)。SDS-PAGE

Purification step	Protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	251	3,320	13.2	1	100
Ni Sepharose	4.64	1,530	330	25.0	46.1
Dialysis	2.05	739	360	27.3	22.3

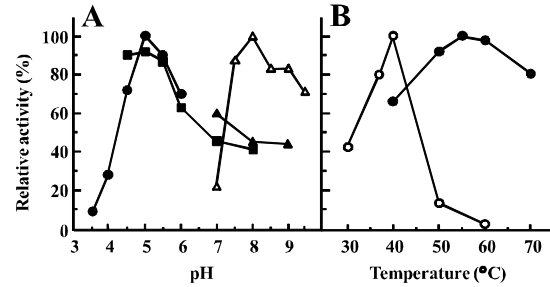
から算出された分子量はおよそ 33.0 kDa で DNA 配列から予想される分子量 34,221 Da と良く一致していた。既知パントテン酸キナーゼはホモ二量体として機能するため、Sephacryl-S200 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いてサブユニット構造の解析を試み

たが、カラム内でタンパク質が沈殿するため算出することができなかった。

(3) *P. torridus* 由来パントテン酸キナーゼの性質と反応動学的解析

P. torridus 由来 CoaA の最適 pH は 5 で、4.5 から 6 の間で最大活性の 70% 以上を示した。一方、原核 I 型 CoaA の代表である *E. coli* 由来 CoaA の最大活性は pH8 付近であった(図 5A)。*P. torridus* 由来の α -グルコシダーゼお

図5. 最適 pH (A) および最適温度 (B)



よび α -マンノシダーゼも pH5 付近に最大活性を持つ。このように *P. torridus* 由来の酵素は一般微生物とは異なり、酸性側で良く機能する。これは *Picrophilus* の細胞内 pH が 4.6 というように良く一致する。最適温度は 55°C で、50 から 70°C で最大活性の 80% 以上を示した(図 5B)。これは *P. torridus* の最適生育温度である 60°C と良く一致する。一方、*E. coli* 由来 CoaA は 50°C で最大活性の 12.6%、60°C で 2.3% しか示さない。

原核型および真核型パントテン酸キナーゼは一般に Mg^{2+} を要求する。カビ由来パントテン酸キナーゼでは Mg^{2+} が最も効果的であるが、*P. torridus* および *E. coli* 由来 CoaA は Mg^{2+} より Mn^{2+} の方をより好むようである(表2)。

TABLE 2. Cation specificity of P_rCoA

Divalent metal ion ^a	Relative activity (%)	
	P _r CoA	EcCoA
none	6.2	6.4
MgCl ₂	100 ^b	100 ^c
CaCl ₂	45.1	27.0
FeSO ₄	80.4	17.9
CoCl ₂	76.6	69.2
MnSO ₄	175	111
ZnCl ₂	85.2	13.9
CuCl ₂	15.7	4.5
NiSO ₄	50.6	21.5

^a 1 mM cation plus 2.5 mM ATP.

^b 252 nmol/min/mg.

^c 341 nmol/min/mg.

特に *P. torridus* 由来 CoaA のリン酸化反応は Mn^{2+} の添加で明らかに促進され、1.75 倍になる。比較すると、古細菌の CoaA 活性は幅広く 2 価の陽イオンを受入れ、*E. coli* 由来 CoaA では 20% 以下しか働かない Fe^{2+} あるいは Zn^{2+} でさえ、最大活性の 80% 以上を示す。また同様に、*P. torridus* 由来 CoaA は幅広くヌクレ

オチドを認識する (表 3)。ATP が最も良いリン酸供与体であったが、GTP および UTP で 80% 以上、最も低い CTP でも 68% の活性を支持する。このように、古細菌由来 CoaA のヌクレオチド認識は緩い。むしろ、*E. coli* 由来 CoaA のヌクレオチドに対する基質特異性が厳格といった方が適切かもしれない。

TABLE 3. Nucleotide specificity of P_iCoaA

NTP ^a	Relative activity (%)	
	P _i CoaA	EcCoaA
ATP	100 ^b	100 ^c
GTP	81.0	40.1
CTP	68.0	4.2
UTP	91.8	19.6

^a 1 mM NTP plus 10 mM MgCl₂

^b 383 nmol/min/mg.

^c 191 nmol/min/mg.

P. torridus 由来 CoaA のパントテン酸および ATP に対する K_m はそれぞれ $621 \pm 10 \mu\text{M}$ および $99 \pm 16 \mu\text{M}$ であった (表 4)。ATP の K_m

TABLE 4. Kinetics parameters of pantothenate kinases

Enzyme	K_m (μM)		k_m (s^{-1})		Source
	Pantothenate	ATP	Pantothenate	ATP	
Prokaryotic type I					
EcCoaA	36 ± 4	136 ± 15	-	-	44
	28	280	-	-	35
P _i CoaA ^d	621 ± 10	99 ± 16	0.818 ± 0.005	0.718 ± 0.081	This work
Prokaryotic type II					
ScCoaA	23	34	1.73	1.57	27
	27 ± 7	93 ± 18	5.48 ± 0.90	4.72 ± 1.82	11
Prokaryotic type III					
P _i CoaA	20	3,166	0.27	0.42	18
BsCoaA	168 ± 27	3,050 ± 520	2.12 ± 0.17	2.12 ± 0.17	9
HpCoaA	101 ± 26	9,590 ± 2,140	2.09 ± 0.26	2.09 ± 0.26	9
	5.5	7,900	-	-	51
Eukaryotic form					
hPank	60	145	-	-	10
mPank1β	5.7 ± 0.5	87 ± 31	-	-	54
mPank3	9.5 ± 1	112 ± 27	-	-	54
hPank2	25.4 ± 3.9	63.6 ± 10.3	-	-	55

^d The determination of kinetic constants were carried out three times independently, and the results were expressed as the mean ± SD. For pantothenate, the kinase activity was assayed with various concentrations of pantothenate (400–4,000 μM) in the presence of 300 μM ATP. For ATP, the pantothenate was fixed at 1,800 μM and the activity was measured with ATP concentrations ranging from 20 to 200 μM .

値は *E. coli* 由来 CoaA に似ていたが、パントテン酸に対する K_m 値は 20 倍高かった。パントテン酸の細胞内濃度は大まかに 20 から 90 μM と見積られるので、*E. coli* 由来 CoaA のパントテン酸に対する K_m 値 (30 μM 前後) は良く一致する。しかしながら、古細菌由来 CoaA のパントテン酸に対する K_m 値は予想よりはるかに高かった。ほとんどのパントテン酸キナーゼの ATP に対する K_m 値はおおよそ 100 μM であるが、パントテン酸に対する K_m は 5.5 から 621 μM と広い範囲あることが明らかとなった。

(4) *P. torridus* での CoA 生合成経路の調節

原核 I 型および真核型パントテン酸キナーゼは CoA およびアシル-CoA によって阻害される。*E. coli* 由来原核 I 型 CoaA は CoA > アセチル-CoA > マロニル-CoA の順で阻害を受ける。真核型酵素は CoA およびアシル-CoA に異なった応答を示す：カビ由来酵素、アセチル-CoA > マロニル-CoA = CoA；マウス由来 Pank1 α および Pank3, アセチル-CoA > マロニル-CoA > CoA；マウス由来 Pank1 β , アセチル-CoA > マロニル-CoA, CoA は活性化；ヒト Pank2, CoA 分子種に非常に感受性

が高い。一方、原核 II 型および原核 III 型 CoaA に分類される酵素は CoA 分子種に対するフィードバック調節に抵抗性がある。そこで、原核 I 型 CoaA に分類される *P. torridus* 由来 CoaA の CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA に対する挙動を検討した (図 6)。*E. coli* 由来 CoaA は CoA 分子種で阻害を受けるが、*P. torridus* 由来 CoaA は 1,000 μM の存在下でも 90% 以上の活性を示した。この結果は *P. torridus* 由来 CoA 生合成経路はパントテン酸キナーゼのステップでは調節されていないことを示しており、原核 I 型 CoaA に分類されるにもかかわらず、CoA による阻害は受けないので、むしろ原核 II 型および原核 III 型 CoaA の性質に似ている。

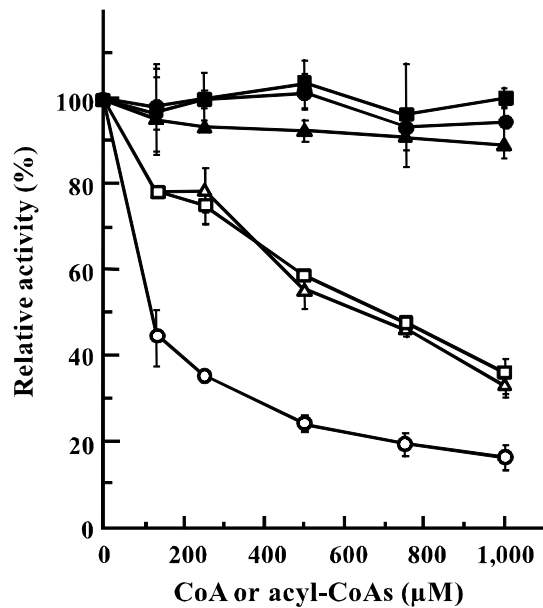


図 6. CoA による古細菌 CoaA の阻害

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)

Masakazu Takagi, Hedeyuki Tamaki, Yukiko Miyamoto, Roberta Leonardi, Satoshi Hanada, Suzanne Jackowski, Shigeru Chohan, Pantothenate kinase from thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus*, Journal of Bacteriology, 査読有, 192 巻, 2010, 233–242.

[学会発表] (計 2 件)

①加藤広己、小松澤俊太、長南茂、メタン生成古細菌のコエンザイムA生合成経路の解析、日本農芸化学会、平成 22 年 3 月 29 日、東京大学 (東京都)

②高木将一、宮本祐規子、森浩二、長南茂、
好酸好熱性古細菌由来パントテン酸キナー
ゼの解析、日本微生物生態学会、平成 20 年
11 月 26・27 日、北海道大学（北海道）

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