

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 -2008
 課題番号：19780054
 研究課題名(和文)発酵生産菌リジン生合成経路の初発酵素アスパラギン酸キナーゼの活性調節機構の解析
 研究課題名(英文)Analysis of regulatory mechanism of aspartate kinase

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

研究成果の概要：グルタミン酸およびリジン発酵で知られる *Corynebacterium glutamicum* のリジン生合成量の調節を主に担っている酵素アスパラギン酸キナーゼ(CgAK)の活性調節サブユニットおよび全体構造の結晶構造決定を行った。CgAK のリジン、スレオニンによるアロステリック調節機構の概要を明らかになり、スクリーニングにより新たな調節解除変異酵素の作製に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：アスパラギン酸キナーゼ、リジン生合成、活性調節機構、*Corynebacterium glutamicum*

1. 研究開始当初の背景

アスパラギン酸キナーゼ(AK)はバクテリア、植物におけるリジン、スレオニン、メチオニン生合成経路の初発酵素である。生物種により AK は様々な調節を受けることが知られている。リジン発酵で知られる *Corynebacterium glutamicum* の AK(CgAK)はこの調節解除変異体によりリジン高生産されることが知られているが、CgAKをはじめとし、どの生物種の AK についてもその立体構造は明らかになっておらず、活性調節の分子

機構は不明のままであった。

2. 研究の目的

CgAK はリジン、スレオニンが同時に存在するときのみに活性阻害をうける「協奏阻害」という極めて稀な特徴をもつことからこの分子機構を解明することは学術的に非常に重要である。また、CgAK の調節解除が *C. glutamicum* におけるリジン高生産の主要因であることから分子機構を解明することにより、より効率的なリジン生産系の設計

のための基盤構築につながると考えられる。

3. 研究の方法

CgAKの活性型、不活性型の立体構造の決定および部位特異的変異酵素の解析により分子機構の解明を目指した。

結晶構造解析

(1) CgAKβ/スレオニン複合体

CgAKのβ-サブユニットの組換えタンパク質を大腸菌にて、大量発現させ、Ni²⁺-アフィニティ精製後、ゲルろ過カラムにて精製、結晶化を行った。精製の間、常に5 mM スレオニンを添加した。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryのビームラインにて1.58 Å分解能の回折データを収集した。別途私たちのグループで多波長異常分散法により決定していた、*Thermus thermophilus*由来のAKの活性調節サブユニットの結晶構造をモデルとして分子置換法によりCgAKβの初期構造を決定し、その後モデル精密化を行い最終構造を決定した。

(2) TtAKβ/スレオニン複合体

TtAKのβ-サブユニットの組換えタンパク質を大腸菌にて、大量発現させ、熱処理後、Ni²⁺-アフィニティ精製、ゲルろ過カラム精製を行い、サンプルを調製した。精製の間、常に5 mM スレオニンを添加した。結晶化スクリーニングにより結晶を得た。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryのビームラインにて2.40 Å分解能の多波長異常分散(MAD)回折データを収集した。重原子サイトの決定、位相決定、初期モデル構築を行った後、モデル精密化を行い、2.15 Å分解能のTtAKβ/スレオニン複合体の構造を決定した。

(3) TtAKβ

TtAKのβ-サブユニットの組換えタンパク質を大腸菌にて、大量発現させ、熱処理後、Ni²⁺-アフィニティ精製、ゲルろ過カラム精製を行い、サンプルを調製した。結晶化スクリーニングにより結晶を得た。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryのビームラインにて2.98 Å分解能回折データを収集した。TtAKβ/スレオニン複合体の結晶構造をモデルとして分子置換法によりTtAKβの構造を決定した。

(4) CgAK/リジン/スレオニン複合体

CgAKの組換えタンパク質を大腸菌にて、大量発現させ、Ni²⁺-アフィニティ精製後、ゲルろ過カラムにて精製、結晶化を行った。精製の間、常に5 mM リジンおよび5 mM スレオニンを添加した。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryのビームラ

インにて2.5 Å分解能の回折データを収集した。CgAKβと*Methanococcus jannaschii*のAKの触媒ドメインの結晶構造をモデルとして分子置換法によりCgAK/リジン/スレオニン複合体の結晶構造を決定した。

(5) CgAK/スレオニン複合体

CgAKの組換えタンパク質を大腸菌にて、大量発現させ、Ni²⁺-アフィニティ精製後、ゲルろ過カラムにて精製、結晶化を行った。精製の間、常に5 mM リジンおよび5 mM スレオニンを添加した。透析によりリジンを除いたのち結晶化条件検討を行った。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryのビームラインにて2.6 Å分解能の回折データを収集した。CgAK/リジン/スレオニン複合体の結晶構造をモデルとして分子置換法によりCgAK/スレオニン複合体の結晶構造を決定した。

部位特異的変異導入タンパク質の解析

(1) 部位特異的変異導入タンパク質の調製

CgAKβについてG28A, V47A, Q49A, N50A, V51A, Q81A, M105A, K106A, S107A, H108A, T112A, E114A, F115Aの変異導入タンパク質をCgAKについてβE3A, αD294A, βD45A, αD294A/βD45Aの部位特異的変異を有するタンパク質を発現させるプラスミドをそれぞれの野生型タンパク質を発現させるプラスミドをテンプレートとして調製した。組換えタンパク質の発現は結晶化サンプルの調製と同様に行った。

また、CgAKの触媒ドメインをコードする遺伝子領域にerror pronePCRによりランダム変異を導入した。AK欠損によりリジン、メチオニン要求性を示す大腸菌にランダム変異ライブラリーを発現させ、リジンアナログ((S)-aminoethylcysteine)、スレオニン存在下における栄養要求性回復を利用したスクリーニングにより、調節解除変異酵素を取得した。導入された変異をシーケンス解析により同定し、各アミノ酸置換体のうちいくつかの点変異置換体(E203V, V146D)を作製した。

(2) 変異タンパク質の分子量解析

CgAKβの野生型およびいくつかの変異タンパク質についてリジン、スレオニン存在下、非存在下における条件でゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量測定を行った。その中のいくつかのタンパク質については超遠心分離を用いた平衡法により分子量測定を行った。

(3) 熱安定性解析

CgAKβおよびTtAKβについてDSC(示差熱走査熱量計)を用いてリジン、スレオニン存在下、非存在下における熱安定性の分析を行っ

た。

(3)変異タンパク質の活性測定

CgAK およびその変異酵素について様々なリジン、スレオニン濃度における活性を測定し、阻害プロファイルを作製した。

4. 研究成果

CgAKの活性調節サブユニットの結晶構造と調節機構の構造的推察

CgAK β /スレオニン複合体の結晶構造を1.58 Å分解能で決定した。調節サブユニットは2つのACT(Aspartate kinase, Chorismate mutase, TyrA)ドメインからなるサブユニットから構成されるダイマーであった。2つの非等価なACTドメインがeffector-binding unitを形成しており、そこへ1つのスレオニン分子が結合していた。もう一つのeffector-binding unitは90度回転して向かい合うように配置していた(図1)。

CgAK β はスレオニン非存在下ではモノマーであり、スレオニン添加によりホモダイマーを形成した。スレオニン結合サイトやダイマー間接触領域に変異を持つタンパク質はこのようなダイマー化が見られなくなった。このことからスレオニンにより誘導されるダイマー化がAKの阻害機構の重要なステップであることが明らかになった。

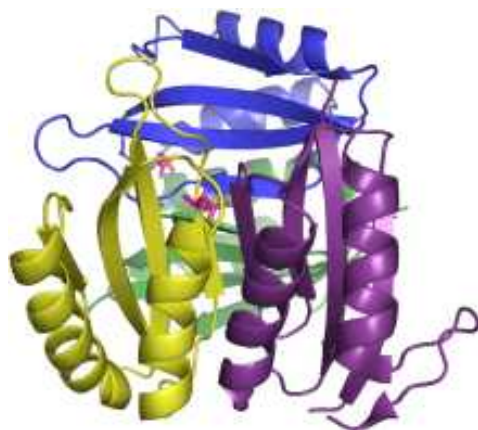


図1 . CgAK β /スレオニン複合体の結晶構造
黄色と緑色が一つ目のサブユニットのACT1とACT2、紫色と青色が他方のサブユニットのACT2とACT1を示す。黄色と紫で一つのeffector binding unitを構成する。Stickモデルで結合したスレオニンを示した。

TtAKの活性調節サブユニットのスレオニン結合に伴う構造変化および耐熱化機構

TtAK β /スレオニン複合体およびTtAK β -freeの結晶構造をそれぞれ2.15, 2.98 Å分解能で決定した。両構造ともダイマーを

形成していたがTtAK-freeのダイマー接触領域は3200Å²とTtAK β /スレオニン複合体の3890Å²と比べて狭くなっていた。超遠心分離を用いた平衡法からTtAK β はモノマーとダイマーの平衡状態で存在しており、スレオニンの結合により平衡がダイマー形成へと向かうことが明らかになった。スレオニン非存在下ではスレオニン結合サイト近傍の β -ストランドが移動しており β 3と β 4の間のループ領域がdisorderしていた。

TtAK β はCgAK β よりも40度も高い耐熱性を有している。結晶構造の比較から、うまく詰まっている疎水性のコアと、ループ領域における多数のプロリンの存在がTtAK β の高い耐熱性の要因であることが示された。

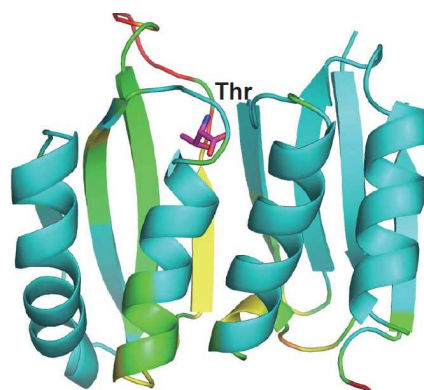


図2 . TtAK β /スレオニン複合体の結晶構造結合したスレオニンをstickモデルで示した。TtAK β /スレオニン複合体とTtAK β -freeとの間での変化の大きさでリボンの色分けをした。青色が1 Å以下、緑色が2 Å以下、黄色が3 Å以下、オレンジが4 Å以下、赤色が4 Å以上

CgAKの不活性型構造と協奏阻害機構

CgAK/リジン/スレオニン複合体およびCgAK/スレオニン複合体の結晶構造をそれぞれ2.50, 2.60 Å分解能で決定した。CgAKは2つの α サブユニットの間と α サブユニットと β サブユニットとの間に接触面を持つ $\alpha_2\beta_2$ ホモテトラマー構造を有していた(図3)。2つのスレオニン分子と1つのリジン分子が β サブユニットと α サブユニットの調節ドメインからなる2つのeffector binding unitに結合していた。CgAK全体に対しては4つのスレオニン分子と2つのリジン分子が結合していた。2つの想定されるリジン結合サイトのうち1つにのみリジンが見られた。2つのサイトを構成するアミノ酸残基に置換を導入した変異酵素の阻害プロファイルの解析から、結晶構造中で見られた活性中心から遠いリジン結合サイトのみ調節に関わ

っていることが示された。

CgAK/スレオニン複合体は CgAK/リジン/スレオニン複合体とほぼ同じ構造を有していた。2つのスレオニン分子が2つの effector-binding unit に結合していた。触媒ドメインの構造を重ね合わせた時、CgAK/リジン/スレオニン複合体と CgAK/スレオニン複合体間で調節ドメインが5度回転していた。同時に、活性中心のアスパラギン酸結合残基(Arg207, Gly208, Thr46)の主鎖と側鎖の位置が変化していた。

今回決定された結晶構造から、これまでに、得られている調節解除変異体におけるアミノ酸置換の多くは活性調節サブユニットに集中していることが明らかになった。これらはスレオニン結合サイトや活性調節サブユニット同士の接触領域に存在し、調節サブユニットにおけるシグナル伝達経路の概要は明らかになったといえる。しかし、阻害シグナルがどのように活性中心へと伝達されるのかは不明な点が多い。そこで、触媒ドメイン内にランダム変異を導入し、調節解除変異体をスクリーニングにより得、詳細に解析し、今回得られた結晶構造と照らし合わせることで伝達に重要なアミノ酸残基を同定することを試みた。その結果、触媒ドメインと活性調節ドメインの接触面に存在する E203V 変異や、触媒ドメイン内のサブドメインである N-lobe と C-lobe の接触面に存在する N78S 変異により阻害が大幅に解除されることが明らかになった。このことから各(サブ)ドメイン間の結合の形成や切断に伴うタンパク質全体の構造変化が活性中心の構造変化へとつながることが示唆される。

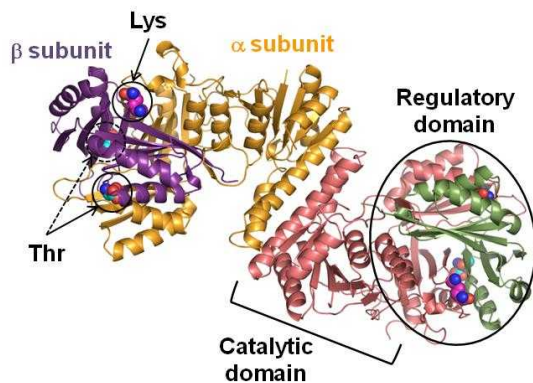


図3 .CgAK/リジン/スレオニン複合体の結晶構造
黄色とピンク色が α -サブユニット、紫色と緑色が β -サブユニットを示した。Catalytic domain を枠線で、Regulatory domain を円で囲い示した。一方の $\alpha\beta$ unit に結合した2つのスレオニン分子と1つのリジン分子を sphere モデルで示した。

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 3 件)

- A. Yoshida, T. Tomita, H. Kono, S. Fushinobu, T. Kuzuyama, M. Nishiyama. Crystal structure of regulatory subunit of aspartate kinase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Journal*. **276**, 3124-3136 (2009) 査読有
A. Yoshida, T. Tomita, T. Kuzuyama, M. Nishiyama. Purification, crystallization, and preliminary X-ray analysis of the regulatory subunit of aspartate kinase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr F*. **63**, 96-98 (2007) 査読有
A. Yoshida, T. Tomita, T. Kurihara, S. Fushinobu, T. Kuzuyama, M. Nishiyama. Structural insight into concerted inhibition of $\alpha_2\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Biol.* **368**, 521-536 (2007) 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

- 吉田彩子、富田武郎、葛山智久、西山真
Corynebacterium glutamicum 由来のアスパラギン酸キナーゼ(の活性制御機構の解析 2009 年度日本農芸化学会大会(福岡) 2009 年 3 月
吉田彩子、富田武郎、葛山智久、西山真
Corynebacterium glutamicum 由来のアスパラギン酸キナーゼ(AK)の活性調節機構の解析 第 8 回蛋白質科学会年会(東京) 2008 年 6 月
吉田彩子、富田武郎、葛山智久、西山真
Corynebacterium glutamicum 由来アスパラギン酸キナーゼ(AK)の活性制御機構の解析 2008 年度日本農芸化学会大会(名古屋) 2008 年 3 月
吉田彩子、富田武郎、葛山智久、西山真
Thermus thermophilus 由来アスパラギン酸キナーゼ活性制御サブユニットの結晶構造解析 理研セミナー「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 6 回連携研究会」2007 年 8 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者