

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07382

研究課題名(和文) 好熱菌におけるアミノ酸シグナル応答機構に関する構造生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of amino acid signal transduction system in thermophilic bacterium

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、伊豆温泉で発見された好熱菌 *Thermus thermophilus* のグルタミン酸脱水素酵素GDHがアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのホモログAPRThとヘテロ複合体を形成していることを発見し、さらにこの複合体がロイシンやアデノシンーリン酸AMPによる活性化を受けることを明らかにした。これまで哺乳類以外の生物由来のGDHにアロステリック調節は存在しないと考えられてきたが、本研究は哺乳類以外の生物由来のGDHにも類似した活性調節が存在することを初めて示した。今後多くの生物におけるGDH調節の研究が行われ、それらが複雑なヒトGDHの調節機構の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that glutamate dehydrogenase (GDH) from *Thermus thermophilus* interacted with a homolog of adenine phosphoribosyltransferase (APRTh). The GDH/APRTh complex was subject to allosteric activation by leucine and AMP. So far, only GDHs from mammalian have been thought to be subject to complicated allosteric regulation. We, however, found that such a complicated regulation of GDH from the organism except for mammalian. This result would lead the research of GDH regulation from various organisms and they would contribute the elucidation of complicated regulatory mechanism of human GDH, which is involved in the important cell homeostasis.

研究分野：応用生物化学

キーワード：アミノ酸代謝調節 アミノ酸シグナル グルタミン酸脱水素酵素 高度好熱菌 ロイシン アロステリック調節 タンパク質間相互作用 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はタンパク質を構成する栄養素として重要であるが、近年、様々なアミノ酸が代謝調節因子として重要な機能を持つことが明らかとなりつつあり、注目を集めている。分岐鎖アミノ酸であるロイシンはヒトにおいてグルタミン酸脱水素酵素 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) を介したタンパク質合成の促進などを行うことによる代謝調節に関わること等が明らかになっている。このようなアミノ酸の効果に関する分子機構を解明し、人々の健康な生活を支える科学的基盤を構築することが近年期待されている。しかしロイシンの作用については調節機構に関与する因子の数が多いうえに制御ネットワークが複雑であることから、その全貌を詳細に解明することは容易ではない。

一方、バクテリアにおいても様々なアミノ酸がそれら自身の合成・分解の調節のみならず代謝調節のシグナル分子として機能する報告がある。バクテリアは比較的代謝がシンプルであるためアミノ酸作用機構の全体像を理解するのに適した材料であると考えられた。また、その成果は、代謝工学・物質生産の効率化に応用できることが期待された。私は研究開始時、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において炭素-窒素代謝の中枢に位置する GDH (TtGDH) 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とを見出し、さらに結晶構造解析によりその構造基盤を明らかにしていた。また、GDH と相互作用するタンパク質が存在することを示唆するデータを得ており、GDH がロイシンとは別の分子によりアロステリック調節を受けると示唆されていた。

2. 研究の目的

ヒト GDH のアロステリック調節は膵臓におけるインスリン分泌や肝臓におけるアンモニア代謝を調節に関わることが示されており、GDH の調節異常を引き起こす変異は、先天性高インスリン/高アンモニア血症の原因であると考えられている。このように GDH が適切に調節されることは代謝恒常性の維持に重要である。ヒトを始めとした哺乳類の GDH はアンテナヘリックスと呼ばれる 50 アミノ酸程度の長さの挿入配列を持ち、これがアロステリック調節に不可欠であることが示されている。一方、バクテリアの GDH はアンテナヘリックスを持たないことからアロステリック調節は存在しないと考えられてきた。しかし、私は、TtGDH がヒト GDH と同様にロイシンによって活性化を受けることを明らかにし、さらに結晶構造解析によりサブユニット間領域にロイシンが結合することで活性化を受けると明らかにしてきた。興味深いことに、ロイシン結合サイ

トを構成する主要なアミノ酸残基はヒトやウシなど哺乳類由来の GDH で保存されており、ヒト GDH2 の変異酵素の解析によりヒトにおいても同様のサイトにロイシンが結合することによって活性化を受けることを示してきた。このようにヒトとは全く異なるバクテリアにおいても類似した GDH のアロステリック調節が存在することが示され、代謝調節における重要性に興味を持たれた。そのような解析を行う過程で私はプルダウンアッセイを用いたスクリーニングにより TtGDH がプリンサルベージ経路のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ APRT のホモログ (APRTh) と相互作用することを見出した。GDH と APRT の間の機能的相関はこれまでに知られておらず、本研究ではこの複合体の機能解析を進めることを目的とした。

他方、バクテリアの GDH としては、グルタミン酸の工業生産に利用されている *Corynebacterium glutamicum* の GDH (CgGDH) が有名である。CgGDH は非常に高いグルタミン酸合成活性を有し、グルタミン酸発酵の成立に不可欠であることからその鍵酵素の一つであると考えられているが、CgGDH がどうしてそのような高活性を持つのかについてはよくわかっていなかった。そこで私は CgGDH の高活性化機構・調節機構を探る目的でその結晶構造解析を行った。

また、私はこれまでに *T. thermophilus* におけるアミノ酸センサータンパク質を探索・機能解析を行う目的で SraA (Stand-alone RAM domain) タンパク質に注目してきた。SraA はその名の通り RAM domain のみから構成されるタンパク質であり、RAM ドメインはアミノ酸結合ドメインとして知られているが、通常ヘリックス-ターンヘリックス型の DNA 結合ドメインと融合し、転写調節因子として働く。このことから SraA も他のタンパク質と相互作用し、機能を有すると予想された。プルダウンアッセイの結果、予想外にトリプトファン生合成経路のアントラニル酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ AnPRT とアノテーションされる TTC1249 と相互作用することを見出した。この複合体の活性を測定した結果、SraA 存在下でトリプトファンにより AnPRT の活性が阻害されることを示していた。RAM ドメインによって酵素活性が調節されることを示したのはこれが初めての例である。本研究では、私はこの阻害の *T. thermophilus* のトリプトファン生合成の調節における意義を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) GDH-APRT 複合体の機能解析

APRT の活性測定

APRT はアデニンとホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) を結合させ、AMP とピロリン酸 (PPi) を生成する酵素である。APRT 活性は生

成した PPI をピロリン酸試薬を用いて検出することで測定した。基質候補としてはアデニン、グアニン、ヒポキサンチン、キサンチンを試した。酵素は APRTh または APRT (TTC1250) を用いた。

GDH の活性測定

GDH は 2-オキソグルタル酸とアンモニウムイオンを NADH を用いてグルタミン酸を生成する反応 (グルタミン酸合成反応) とその逆反応 (グルタミン酸分解反応) を触媒する酵素である。GDH 活性は NADH が NAD⁺ に変換されたときの 340 nm の吸収の減少または NAD⁺ が NADH に変換されたときの吸収の増加を経時的に観察することで測定した。酵素は GDH または GDH·APRT を用いた。エフェクターとして、AMP を含むヌクレオチド化合物、ロイシン等を添加した。

aprth 遺伝子破壊株、高発現株の表現型解析

定法に従って *T. thermophilus* の野生株を aprth 遺伝子破壊または高発現用プラスミドを用いて形質転換し、薬剤耐性マーカーを利用することによって各遺伝子組換え株を得た。野生株及び aprth 遺伝子破壊株、aprth 高発現株を栄養培地にて前培養し、洗浄後、最小培地に植菌し、生育を観察した。

APRTh, APRT, GDH·APRTh の構造解析

GDH·APRTh 複合体の四次構造を決定するためにゲルろ過クロマトグラフィーを用い、分子量測定を行った。また、APRTh が GdhA, GdhB どちらのサブユニットに結合しているのか調べるために GdhA·APRTh, GdhB·APRTh についても同様の解析を行った。

APRTh における AMP の認識機構を明らかにするため結晶構造解析を行うことにした。精製した APRTh を用い AMP 存在下、非存在下で千条件以上の結晶化条件スクリーニングを行った。また、APRT、GDH·APRTh に関しても対応する基質または基質アナログの存在下、非存在下で結晶化条件スクリーニングを行った。

(2) CgGDH の機能構造解析

CgGDH の結晶構造解析

大腸菌を用いて CgGDH の組換えタンパク質を大量発現させ、Ni²⁺アフィニティー精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行うことによって単一になるまで精製した。これを濃縮し結晶化用サンプルとし、基質存在下、非存在下で数百条件の結晶化スクリーニングを行った。

CgGDH の活性測定

TtGDH の活性測定と同様の方法で行った。測定温度は 30 度とした。

CgGDH の部位特異的変異体の解析

CgGDH を発現させるためのプラスミドを鑄型として、市販のキットを用いて部位特異的変異を導入した。このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、変異酵素の調製を行った。

CgGDH の分子動力学 (MD) シミュレーション

MD シミュレーションの鑄型構造として CgGDH の NADP⁺, 2-イミノグルタル酸 (2-IG) 複合体の結晶構造を用いた。Simulation 1 では NADP⁺ を NADPH に、2-IG を 2-オキソグルタル酸に置換した。Simulation 2 では NADP⁺ を NADPH に、2-IG をグルタミン酸に置換した。ABMERTOOLS version 1.5 の LEaP module を用いてタンパク質から最低 10 Å 以内に水分子を置き、静電的に中性にするために Na⁺イオンを置いた。

それぞれの Simulation につき 2 回の MD run が GROMACS package version 4.6.5 を用いて行われた。タンパク質、リガンド原子の最適化を行った後、50 ns の simulation を行った。

(3) SraA の機能解析

アントラニル酸合成酵素 AS の活性測定

一般に AS がトリプトファンによるフィードバック阻害を受ける阻害を受けることが知られているが、*T. thermophilus* の AS が同様な阻害を受けるかどうか調べた。AS 活性は酵素反応によって生成するアントラニル酸の蛍光を蛍光分光光度計を用いて測定した。コリスミ酸、グルタミン酸、マグネシウムイオンを含む反応液に AS を添加し、蛍光の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) GDH·APRT 複合体の機能解析

「2. 研究の目的」で述べたプルダウンアッセイでは GdhA サブユニットにアフィニティータグを付加したため GdhB サブユニットとの分子量がほぼ等しくなってしまう、GDH·APRTh 複合体の形成が確認できなかった。そこで APRTh にアフィニティータグを付加したタンパク質を発現する組換え株を作製し、発現精製した結果、GdhA, GdhB, APRTh から構成される GDH·APRTh 複合体の形成が確認された。これに関して生化学的解析を行うためには複合体の量が少なかったため、大腸菌を用いて GDH·APRTh 複合体を発現させ、十分量の複合体を得た。生化学的解析の結果、この複合体は GDH よりもロイシンによる活性化をより強く受けることが明らかになった。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定の結果、この複合体は 4 つの GdhB サブユニット、2 つの GdhA サブユニット、2 つの APRTh サブユニットから構成されることが明らかになっ

た。

興味深いことに APRTh はそれをコードする遺伝子の直上流にもうひとつ APRT をコードする遺伝子が存在し、オペロンを形成している。これらの酵素活性を測定した結果、APRT は実際に APRT 活性を有している一方で、APRTh は APRT 活性や別のプリン基質に対する活性を示さなかった。このことから APRT は真に APRT である一方、APRTh は GDH と相互作用することによって GDH の活性を調節する因子であると考えられた。APRTh と APRT の活性中心のアミノ酸配列の比較から APRTh は酵素活性を持たないものの活性中心ポケットの形状は維持している可能性が考えられた。そこで、プリン塩基や、プリンヌクレオチドを結合する可能性が考えられた。エフェクター探索の結果、APRT の反応産物である AMP により GDH 活性が上昇することがわかった。さらに、AMP はロイシンと協調して相乗的に GDH の活性化を行うことが示された。

これまで TtGDH を含むバクテリア由来の GDH はアロステリック調節を受けないと考えられてきたが、これまで述べた通り TtGDH は複雑な複合体構造をとることによって様々なアロステリック調節を受けることが本研究により初めて明らかになった。ヒト GDH はロイシン、ADP による活性化の他、GTP, NADH, パルミトイル CoA によるアロステリック調節、サーチユインタンパク質 SIRT4 による ADP リボシル化により複雑な調節を受けることが知られている。ADP は細胞のエネルギー低下を示すシグナルであり、これにตอบสนองして GDH がインスリン分泌を促進すると考えられている。AMP もまたエネルギー低下のシグナルであり、*T. thermophilus* ではインスリンは存在しないが類似したエネルギー応答機構が存在するのかもしれない。また、APRTh は AMP を感知するセンサーであると考えられるが、APRTh とオペロンを為す APRT はアデニンを基質として AMP を生成する酵素である。このことはプリン塩基の濃度感知・応答機構の存在を示唆しているのかもしれない。APRTh 遺伝子破壊株は最小培地において野生株に比べ、生育遅延を起こすが高発現株では回復している。このことから APRTh は細胞の適切な生育に必要なであると言える。APRTh がどのように細胞の最適な生育に寄与しているか調べることは今後の課題である。

これまで哺乳類以外の GDH はアロステリック調節をうけないと考えられてきたが、本研究によりバクテリアの GDH も複雑にアロステリック調節を受けることが証明できた。このことは、他の様々な生物種の GDH でも類似したアロステリック調節が存在する可能性を示しており、今後多くの生物種の GDH の調節機構を研究することで複雑で解析困難とされるヒト GDH の調節機構の解明

にも寄与するものと期待される。

(2) CgGDH の機能構造解析

結晶化条件のスクリーニングの結果、CgGDH の良質な結晶を得ることに成功し、2-イミノグルタル酸 (2-IG)、NADP⁺ 複合体の結晶構造決定に成功した。CgGDH は他のバクテリア GDH と同様にホモ 6 量体構造を有していた。そのうち 4 つは反応中間体、補酵素を結合した closed form、残りの 2 つは基質が結合していない open form であった。2-イミノグルタル酸のイミノ基は NADP⁺ のニコチンアミド環とスタッキングしており、以前から予想されていた反応機構における NADPH のヒドリド転移直前のイミノ中間体構造を捉えたものと考えられた。この結果は、酵素構造の観点から初めて予想反応機構の証拠を提示したものと考えられる。

この構造を鋳型として MD シミュレーションを行うことによって、グルタミン酸合成反応の高活性化機構の解析を行った。その結果、初期条件においてグルタミン酸を結合した分子は 50 ns の間に closed form から open form へと変化し、グルタミン酸を放出してしまうのに対して、2-オキソグルタル酸を結合した条件では closed form を維持していた。CgGDH の酵素反応の動力的解析においても実際にグルタミン酸に対する K_m が 50 mM と非常に親和性が低いのに対し、2-オキソグルタル酸に対する K_m が 890 μ M と非常に親和性が高い。この違いが、細胞内でもグルタミン酸合成に偏っている原因となっていることが原子レベルで実証された。

また、TtGDH の解析から別の生物種の GDH にもアロステリック調節がある可能性が示されたため、CgGDH でも類似の調節があるかどうか調べた。組換え酵素を用いて各種アミノ酸による活性への影響を調べたが現在のところ、活性調節は観察されていない。

(3) SraA の機能解析

T. thermophilus 由来の AS の組換え酵素を大腸菌を用いて調製し、その活性を測定した。その結果、10 μ M のトリプトファンにより活性が 1% 程度まで阻害されることがわかった。AnRPT・SraA が 100 μ M のトリプトファンで 50% 程度まで阻害されることと比べると AS の阻害は *T. thermophilus* においてトリプトファン合成調節の主要な要因であることが強く示唆された。一方で、AS の次の反応を担う AnPRT の調節は通常条件ではトリプトファン合成量の調節における寄与は小さい可能性が考えられた。しかし、トリプトファンによる阻害を受けることが示されている *Salmonella typhimurium* 由来の AnPRT ではトリプトファンはコリスミ酸に対し、競合的に阻害することが示されている。このことは、コリスミ酸濃度が高いときに AnRPT の阻害が効果を発揮することを示しているのかもしれない。また、AnRPT の

もう一つの基質は核酸生合成の鍵化合物のひとつである PRPP であることから、SraA による AnRPT の活性調節は PRPP の不必要な消費を抑えるためにある可能性も考えられた。

5. 主な発表文等

(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)

Takeo Tomita, Structure, function, and regulation of enzymes involved in amino acid metabolism of bacteria and archaea, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, Vol.81, No. 11, 2017, pp. 2050-2061, DOI:10.1080/09168451.2017.1365593

Tetsuo Kubota, Hajime Matsushita, Takeo Tomita, Saori Kosono, Minoru Yoshida, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama, Novel stand-alone RAM domain protein-mediated catalytic control of anthranilate phosphoriboxyltransferase in tryptophan biosynthesis in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles*, 査読有, Vol.21, No.1, 2017, pp. 73-83, DOI:10.1007/s00792-016-0884-0

Takeo Tomita, Lulu Yin, Shugo Nakamura, Saori Kosono, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama, Crystal structure of the 2-iminoglutarate-bound complex of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*, *FEBS Lett.*, 査読有, Vol.591, No.11, 2017, pp. 1611-1622, DOI:10.1002/1873-3468.12667

[学会発表](計7件)

富田武郎、テルペン合成酵素の機能改変とグルタミン酸脱水素酵素の調節機構、第6回生物工学会東日本支部コロキウム(東京) 2018年3月2日

Takeo Tomita, Makoto Nishiyama, Regulatory mechanism of glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*, Italy-Japan Joint symposium New Trends in Enzyme and Microbial Science in the Translational Biology Era (Naples, Italy) 2017年10月18-20日

Takeo Tomita, Makoto Nishiyama, Regulatory mechanism of glutamate dehydrogenase from *Thermus*

thermophilus, ICC05-AEM2016 (Toyama, Japan) 2016年9月4-8日

富田武郎、アミノ酸代謝に関わる酵素に関する構造生物学的研究 日本農芸化学会2016年度第一回関東支部例会(東京) 2016年6月25日

Takeo Tomita, Crystal structure of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* in a complex with 2-iminoglutarate, Miniworkshop on Corynebacterium. (東京) 2016年6月21日

富田武郎、アミノ酸代謝に関わる酵素に関する構造生物学的研究 日本農芸化学会2016年度大会(札幌) 2016年3月27日

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

[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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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：

(4)研究協力者
()