

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15437

研究課題名（和文）メチオニン生合成酵素における新規フィードバック制御機構の解明

研究課題名（英文）Studies on novel feedback mechanism of methionine biosynthetic enzyme

研究代表者

長谷部 文人（Hasebe, Fumihito）

福井県立大学・生物資源学部・助教

研究者番号：30781801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細菌のメチオニン生合成における酵素の活性制御機構に着目し、緑膿菌が有する機能未知タンパク質MetW(PaMetW)がメチオニン生合成酵素MetX(PaMetX)の活性制御を担うことを解明した。またPaMetWの変異体ではフィードバック阻害剤の効果が緩和されることを明らかにした。さらにPaMetWがPaMetXと相互作用すること、その相互作用にはPaMetWのN末端側とPaMetXのC末端側の領域が重要であることを明らかにした。AlphaFold2を用いて作製した複合体モデルにおいて、上記の相互作用に重要な領域が近傍に配置されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、緑膿菌などの細菌が有する機能未知タンパク質MetWが必須アミノ酸であるメチオニンの生合成酵素MetXの活性制御を担うタンパク質であることを明らかにし、MetWとMetXとの相互作用に重要な領域を明らかにした。本研究成果は、メチオニン生合成においてフィードバック阻害による活性制御機構に多様性が存在することを示しただけでなく、今後のメチオニン関連代謝産物の発酵生産やMetWを標的とした抗菌剤開発への寄与も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the regulation of the enzymatic activity involved in the methionine biosynthesis and revealed that the uncharacterized protein MetW from *Pseudomonas aeruginosa* (PaMetW) regulated the succinyl-transferase activity of MetX from *P. aeruginosa* (PaMetX). In addition, we also clarified that the alanine substitution of the glycine-rich sequence of the PaMetW relieved the feedback inhibitory effect by the S-Adenosyl-L-homocysteine (SAH).

Furthermore, we demonstrated that the N-terminal region of PaMetW and the C-terminal region of PaMetX were significant for the interaction between PaMetW and PaMetX. This result coincided with the complex model of PaMetW and PaMetX generated by AlphaFold2.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メチオニン 生合成 フィードバック阻害 活性制御 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

Methionine は生育に必須なアミノ酸の1つであり、タンパク質の合成や生体内反応に広く用いられる S-Adenosyl-L-methionine (SAM) の合成にも使用される。ヒトを含む哺乳類は Methionine 生合成経路を持たない一方で、微生物や植物は Methionine 生合成経路を有する。それゆえ、Methionine 生合成機構に関する新たな知見は、Methionine や SAM の発酵生産や抗菌剤開発の重要な基盤となる。

細菌の Methionine 生合成において、L-Homoserine のアシル化反応は互いに配列相同性を持たない MetA と MetX が各々担う(図 1)。MetA や MetX は、代謝系の生産物である Methionine や SAM によりフィードバック阻害を受ける例が知られている(図 1)。しかし一方で、*Leptospira meyeri* が有する MetX のように Methionine や SAM による阻害を受けない例も報告され(図 1)、MetX の活性制御機構には不明瞭な所があった。

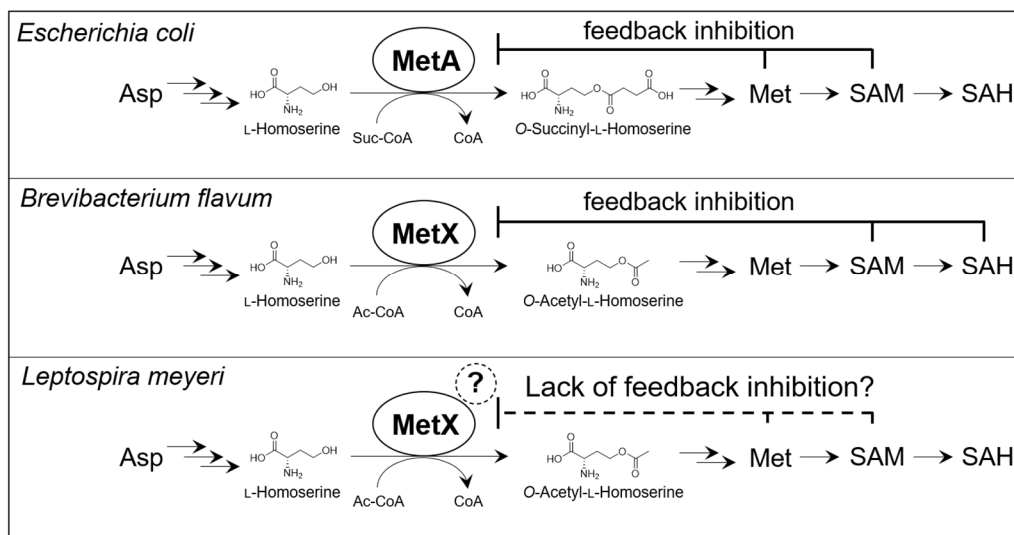


図 1: 細菌の Methionine 生合成とフィードバック阻害

*metW* は *metX* の下流に存在し、Methionine 生合成に関与する遺伝子として 1998 年に *Pseudomonas syringae* から発見された。2019 年時点で、Pfam データベースには 1669 種が *metW* を有する株として登録されていた。*metW* は高頻度で *metX* と隣接しており、日和見病原菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* を含むプロテオバクテリア門の細菌に広く分布する(図 2)。MetW は S-Adenosyl-L-homocysteine (SAH) により阻害を受けることが知られる SAM-dependent methyltransferases (SAM-MT) superfamily に分類されていたが、MetW の機能の詳細および分子機構についての報告はなかった。

Bacteria	Proteobacteria		<i>metX metW</i>	
			<i>metX</i>	<i>metW</i>
		α-;	<i>Acetobacter aceti</i>	□□□□■□□□
			<i>Sphingobium japonicum</i>	□□□□■□□□
			<i>Ralstonia solanacearum</i>	□□□□■□□□
		β-;	<i>Burkholderia mallei</i>	□□□□■□□□
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	□□□□■□□□
		γ-;	<i>Acinetobacter baumannii</i>	□□□□■□□□
			<i>Halomonas elongata</i>	□□□□■□□□
		δ-;	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	□□□□■□□□
			Spirochaetes	<i>Leptospira interrogans</i>
Actinobacteria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	□□□□■□□□		

図 2: *metX/metW* を有する菌株例

2. 研究の目的

フィードバック阻害は菌体内成分量の調節に重要な役割を果たしていることから、低分子による阻害が観測されない MetX では、MetW を介した活性制御機構が存在するのではないかと考えられた。そこで本研究では、*P. aeruginosa* が有する MetX(PaMetX)と機能未知タンパク質 MetW(PaMetW)に着目し、Methionine 生合成酵素の新規な活性制御機構の解明を目的とし、

MetW 共存下で、フィードバック阻害を起こす代謝産物の特定と MetX と MetW との相互作用に必要なタンパク質領域の特定を目指した。*metW/metX* は人獣共通病原性細菌である *Leptospira interrogans* や *Burkholderia mallei*、植物病原菌 *Ralstonia solanacearum* などにも分布することから、本研究成果はヒトや植物の病原菌に対する抗菌剤開発においても重要な知見を与えることが期待される。

### 3. 研究の方法

MetW 共存下で、フィードバック阻害を起こす代謝産物の特定

*P. aeruginosa* NBRC 106052 のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、*PametW* と *PametX* を pETDuet-1 や pRSFDuet-1 に導入したプラスミドを作製した。この際、PaMetX は N 末端に His タグが付加するように、PaMetW は His タグ非付加体が発現するように設計した。作製したプラスミドを *E. coli* BL21(DE3) に導入し、発現・誘導を行い、Ni カラムを用いて組換え酵素の取得を行った。取得した組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行い、反応溶液を LC-HRMS を用いて分析し反応産物である *O*-Succinyl-L-homoserine の生産量を定量することで、PaMetX 単独条件と PaMetX と PaMetW の共存条件での各々の比活性を算出した。反応溶液には、それぞれ阻害候補となるメチオニン関連代謝産物として L-Cystathionine, L-Homocysteine, L-Methionine, SAM, SAH を添加し、実験を行った。フィードバック阻害剤を見出した後に、阻害剤認識に関与する残基候補の変異体を作製し、その影響を評価した。

MetX と MetW との相互作用に必要なタンパク質領域の特定

His タグ付加体 PaMetX とタグ非付加体 PaMetW を *E. coli* BL21(DE3) を用いて共発現させ、Ni カラムを用いて精製し、精製画分を SDS-PAGE に供することで、PaMetX と PaMetW との相互作用について検討を行った。また PaMetX や PaMetW の C 末端欠損体やアラニン置換体を作製し、プルダウンアッセイを行うことで相互作用に必要な領域の探索を行った。

### 4. 研究成果

MetW 共存下で、フィードバック阻害を起こす代謝産物の特定

PaMetX 単独での *in vitro* 反応の結果、その比活性は  $0.00485 \pm 0.00086$  U/mg であり、メチオニン関連代謝産物を反応系に添加してもそれらの比活性の顕著な減少は観測されなかった。一方で、PaMetW 共存下での比活性は  $2.89 \pm 0.31$  U/mg であり、SAH 添加条件においてその活性は  $0.13 \pm 0.05$  U/mg であった。以上から、PaMetW が共存することにより *O*-Succinyl-L-homoserine への変換活性は PaMetX 単独条件よりも約 600 倍上昇すること、PaMetX 単独条件では観測されなかった SAH による活性阻害が起こることが明らかになった(図 3)。

PaMetW はその配列中に Glycine リッチな配列モチーフを有し、このモチーフが SAH の認識に関与すると推測された。そこでこのモチーフの変異体を作製し、*in vitro* 反応をした結果、SAH による阻害効果が緩和されることを明らかにした。

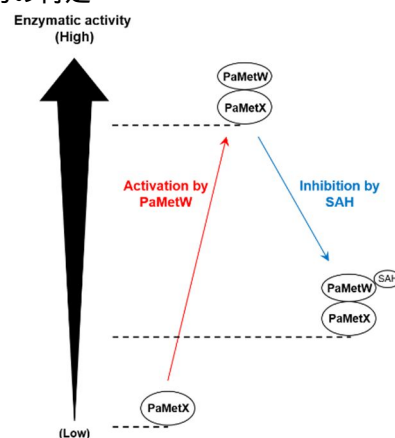


図 3 : MetW を介した活性制御

MetX と MetW との相互作用に必要なタンパク質領域の特定

タグ非付加体の PaMetW が His タグ付加体の PaMetX と共精製された結果から、PaMetW は PaMetX と相互作用することが明らかになった。そこで、PaMetW と PaMetX それぞれについて C 末端欠損体を作製し、プルダウンアッセイを行うことで相互作用に必要な領域・残基の探索を行ったところ、PaMetW の N 末端側と PaMetX の C 末端側の領域が重要であることが明らかになった。さらに、Google Colaboratory 上で公開されている AlphaFold2 を用いて PaMetX と PaMetW の複合体モデルを作製したところ、上記で得た結果と同様に PaMetW の N 末端側と PaMetX の C 末端側の領域が近傍に配置されることが確認され、これらの領域で直接相互作用することが強く示唆された(図 4)。

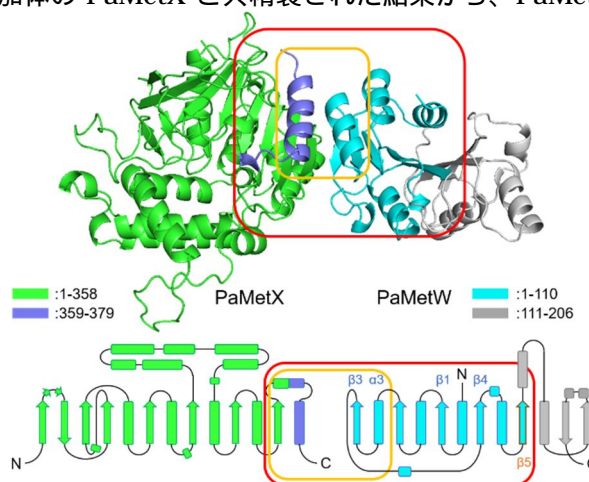


図 4: PaMetX と PaMetW の複合体モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasebe Fumihito	4. 巻 85
2. 論文標題 MetW regulates the enzymatic activity of MetX in Pseudomonas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 351 ~ 358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷部文人
2. 発表標題 メチオニン生合成におけるMetWによるMetXの活性制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷部文人
2. 発表標題 メチオニン生合成における新奇な酵素活性制御タンパク質の研究
3. 学会等名 生合成若手シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷部文人、丸山千登勢、濱野吉十
2. 発表標題 メチオニン生合成酵素MetXとMetWの相互作用領域の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------