

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05348

研究課題名(和文) 超好熱菌が有するユニークなD-アミノ酸代謝経路の同定

研究課題名(英文) Identification of D-amino acid metabolic pathways in hyperthermophile

研究代表者

宮本 哲也 (Miyamoto, Tetsuya)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：10739238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、超好熱菌 *Thermotoga maritima* における新規のD-アミノ酸代謝経路を明らかにすることを目的としており、推定アミノ酸代謝酵素の酵素学的機能解析によって、D-アミノ酸代謝能を有する、数種類の酵素を見出すことに成功した。これらの酵素は、複数の異なるアミノ酸代謝活性を有する多機能型酵素であった。また、細菌のペプチドグリカンに含まれる重要な構成要素であるD-グルタミン酸が、本細菌では新規のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼによって合成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

細菌においてD-アミノ酸は、細菌の環境適応に関わる重要な生理的機能分子である。超好熱菌 *Thermotoga maritima* のペプチドグリカンは、3種類のD-アミノ酸を含み、ユニークな構造を有している。本研究においては、このうちD-グルタミン酸の合成経路を明らかにしており、これは細菌の環境適応機構を理解する上で非常に重要である。また、D-アミノ酸が多機能型代謝酵素を介して代謝されるという新規のD-アミノ酸代謝経路を見出したことは、各種生物におけるD-アミノ酸バイオシステムの理解にも繋がる重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify novel D-amino acid metabolic pathways in hyperthermophile *Thermotoga maritima*. We identified several enzymes that have D-amino acid-metabolizing activity through functional analysis of various enzymes. These enzymes displayed several different activities associated with amino acid metabolism. These studies also revealed that D-glutamate, which is an important component in bacterial peptidoglycan, is produced by novel D-amino acid aminotransferase in *T. maritima*.

研究分野：生化学

キーワード：D-アミノ酸 アミノ酸ラセマーゼ D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ 多機能型酵素 ペプチドグリカン 超好熱菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

細菌において D-アミノ酸は、細胞壁ペプチドグリカンや抗生物質の構成成分として利用されているだけでなく、様々な生理機能を有することが明らかとなっている。特に、細菌のバイオフィルムの形成と解体の制御に関与していることが注目されており、数多くの研究によって D-アミノ酸の有効性が評価されている。細菌のペプチドグリカンには、一般的に D-アラニン (D-Ala) と D-グルタミン酸 (D-Glu) の 2 種類の D-アミノ酸が含まれているが、これら以外にも様々な種類の D-アミノ酸がペプチドグリカンに組み込まれる。これにより、細菌はペプチドグリカンの構造を変化させ、様々な環境に適応していると考えられている。すなわち、細菌において D-アミノ酸は、変化する環境に対応し、その環境で生存するための生理的機能分子であると考えられる。従って、細菌における各種 D-アミノ酸の代謝経路及びその生理機能について明らかにすることは、細菌の環境適応戦略を解明するために欠かすことのできない重要な課題である。

細菌において D-アミノ酸は、主にアミノ酸ラセマーゼによってそれぞれ対応する L-アミノ酸から合成される。ペプチドグリカンの構成成分である D-Ala と D-Glu は、それぞれのアミノ酸ラセマーゼによって合成される。我々は、超好熱菌 *Thermotoga maritima* に注目して、D-アミノ酸代謝酵素の探索及び同定を行っている。*T. maritima* は、90°Cまで生育可能なグラム陰性の嫌気性細菌である。この細菌のペプチドグリカンは、D-Ala と D-Glu の他に D-リジン (D-Lys) を含むというユニークな特徴を有している。細菌においてペプチドグリカンは、単に細胞構造の維持だけでなく、変化する環境に対応し、生存するためには欠かせない構造体である。そのため、極限環境下で生育する *T. maritima* のペプチドグリカンに含まれる D-アミノ酸の代謝経路を明らかにすることは、細菌の環境適応機構の理解に繋がる。

## 2. 研究の目的

本研究では、超好熱菌 *T. maritima* のペプチドグリカンに含まれる D-アミノ酸の代謝経路を明らかにするために、これまでの知見に基づいて抽出した、推定アミノ酸代謝酵素の機能を解析し、D-アミノ酸代謝能を有する酵素を網羅的に同定する。これまでの我々の解析から、D-アミノ酸に対して特異的にアミノトランスフェラーゼ活性を示す、新規の酵素を見出している。興味深いことに、本酵素はこのアミノトランスフェラーゼ活性に加えて、アミノ酸ラセマーゼ活性をも有することを発見した。本酵素は、*T. maritima* において D-アミノ酸の代謝に関与している可能性が高く、さらに異なる 2 つの反応を触媒するというユニークな特徴を有することから、詳細な酵素学的解析を行うことで、本酵素の性質及び機能を明らかにする。この酵素に加えて、同様に抽出した、その他の推定アミノ酸代謝酵素についても D-アミノ酸代謝能を有するかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *T. maritima* における D-アミノ酸代謝酵素の同定及び機能解析

*T. maritima* のゲノムから数種類の推定アミノ酸代謝酵素の遺伝子を抽出し、これらの遺伝子を大腸菌発現用プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドをそれぞれ大腸菌に導入し、タンパク質の高発現、続いて精製を行い、組換え体酵素を取得した。この精製酵素を用いて、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性やアミノ酸ラセマーゼ活性などの測定を行った。両活性は、酵素反応液中のアミノ酸を蛍光誘導体化し、ODS カラムを備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、測定した。すでに、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有することを見出している酵素については、さらに詳細な酵素学的機能解析を行った。具体的には、アミノ基ドナー 及びアミノ基アクセプターの特異性の解析、pH 依存性、温度依存性の解析を行った。また、アミノトランスフェラーゼ活性における動力学定数を算出し、解析した。さらに、本酵素はアミノ酸ラセマーゼ活性を有していることを確認していたため、この活性についても同様に酵素学的解析を行った。さらに、その他の酵素についても同様に各酵素活性の解析を行った。

### (2) 好熱菌を用いた D-アミノ酸代謝酵素の生理的関与の検証

*T. maritima* 由来の酵素が生理的に D-アミノ酸の代謝に関与しているかどうかを *in vivo* の実験系にて評価した。本研究では、好熱菌において遺伝子操作系が確立している高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を用いた。すでに、*T. thermophilus* の有する Glu ラセマーゼ遺伝子を欠損した株の作製に成功しており、*T. maritima* 由来の D-Glu 合成能を有している酵素をコードしている遺伝子をこの Glu ラセマーゼ欠損株に導入することによって、D-Glu を含まない培地においてその生育が回復するかどうかを生理的に機能するかどうかの指標とした。この遺伝子相補実験によって、*T. maritima* 由来の酵素が生理的に D-Glu 合成に関与するかどうかを評価した。また、D-Ala 合成を評価するための *in vivo* 実験系を確立するために、*T. thermophilus* における Ala ラセマーゼ遺伝子欠損株の作製を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) *T. maritima* における D-アミノ酸代謝酵素の同定及び機能解析

本研究では、以下に示す *T. maritima* の酵素について機能解析を行い、D-アミノ酸代謝活性を明らかにした。

##### D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ

*T. maritima* は、細菌がほぼ普遍的に保有する Ala ラセマーゼ及び Glu ラセマーゼを有していなかった。そこで、アミノ酸アミノトランスフェラーゼを介した D-アミノ酸代謝経路に注目し、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを見出した。本酵素は、20 種類以上の D-アミノ酸に対して活性を示したが、L-アミノ酸に対しては一切活性を示さなかった。触媒効率が最も高いアミノ基ドナーは D-Glu であったが、細胞内の D-アミノ酸としては一般的ではない D-ホモセリンと D-グルタミンに対する代謝回転数は D-Glu よりも高かった。また、アミノ基アクセプターとしては 2-オキシグルタル酸に対する活性が最も高かった。さらに、本酵素はアミノトランスフェラーゼ活性に加えて、アスパラギン酸 (Asp) や Glu を含めた 4 種類のアミノ酸に対するラセマーゼ活性を有していた。従って、本酵素は異なる活性を有する多機能型酵素であり、D-アミノ酸代謝に関与することが明らかとなった。

##### アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ (AcOAT)

AcOAT は、L-アルギニン合成経路において N-アセチル-L-オルニチン (Ac-L-Orn) 合成の役割を担う酵素である。*T. maritima* における AcOAT の最適なアミノ基ドナーとアクセプターは、それぞれ Ac-L-Orn と 2-オキシグルタル酸であった。また、アスパラギンやセリンを含む 4 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示した。さらに、L-システイン (L-Cys) を分解する活性 (リアーゼ活性) を有することを見出した。ラセマーゼ活性及びリアーゼ活性は、アミノトランスフェラーゼ活性よりも低かったが、*T. maritima* の AcOAT は異なる 3 つの活性を有する多機能型アミノ酸代謝酵素であることを明らかにした。

##### O-アセチルホモセリンスルフィドラーゼ

本酵素は、L-メチオニン合成経路において O-アセチルホモセリンと硫化水素からホモシステインと酢酸を合成する反応を触媒する。*T. maritima* 由来の O-アセチルホモセリンスルフィドラーゼは、2 種類のアミノ酸に対して微弱なラセマーゼ活性を示した。また、本酵素は L-Cys に対してリアーゼ活性を示した。さらに、アミノ基ドナーとアクセプターの組み合わせによっては、アミノトランスフェラーゼ活性を示すことが明らかとなった。従って、*T. maritima* の O-アセチルホモセリンスルフィドラーゼは、ラセマーゼ活性、リアーゼ活性、アミノトランスフェラーゼ活性を有する、多機能型アミノ酸代謝酵素であることを明らかにした。

##### 2 種類のアミノ酸アミノトランスフェラーゼ

*T. maritima* には、相同性のある 2 種類の推定アミノ酸アミノトランスフェラーゼが存在していた。そのうちの一つは、L-Asp に対して特異性の高い Asp アミノトランスフェラーゼであることが明らかとなった。もう一つのアミノトランスフェラーゼは、幅広い L-アミノ酸に対して活性を示し、その中でも L-Ala に対して高い活性を示した。また、両酵素ともに数種類のアミノ酸に対して微弱なラセマーゼ活性を示すことを明らかにした。

##### L-*allo*-スレオニンアルドラーゼ

本酵素は、L-*allo*-スレオニン (L-*allo*-Thr) をグリシンとアセトアルデヒドに変換する反応を触媒する。*T. maritima* の L-*allo*-Thr アルドラーゼは、L-*allo*-Thr 及び L-Thr に対してアルドラーゼ活性を有しており、それぞれの D 体に対しては活性を示さなかった。さらに、2 種類のアミノ酸に対して微弱なラセマーゼ活性を有していることが明らかとなった。

##### (2) 好熱菌を用いた D-アミノ酸代謝酵素の生理的関与の検証

実験 (1) で同定した D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが細胞内で D-Glu 合成に関与するかどうかを検証するために、Glu ラセマーゼ遺伝子を欠損した *T. thermophilus* にその遺伝子を導入した。Glu ラセマーゼ遺伝子欠損株の生育は、野生型と比較すると著しく低下するが、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子を導入した欠損株の生育は野生型と同程度まで回復した。従って、*T. maritima* 由来の D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、生理的に D-Glu 合成の役割を担っていることを明らかにした。

また、*T. maritima* の D-Ala 合成経路も同様に明らかとなっていない。そこで、生理的に D-Ala 合成に関与する酵素を同定するために、Ala ラセマーゼを欠損させた *T. thermophilus* を作製した。この欠損株は、D-Ala を含まない培地では生育しないことを確認した。今後、この Ala ラセマーゼ欠損株に *T. maritima* 由来のアミノ酸代謝酵素の遺伝子を導入することで、生理的に D-Ala 合成に寄与する酵素を同定する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyamoto Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Multifunctional enzymes related to amino acid metabolism in bacteria	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbae027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto Tetsuya, Fushinobu Shinya, Saitoh Yasuaki, Sekine Masae, Katane Masumi, Sakai Kato Kumiko, Homma Hiroshi	4. 巻 291
2. 論文標題 Novel tetrahydrofolate dependent D serine dehydratase activity of serine hydroxymethyltransferases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 308 ~ 322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16953	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 -
1. 著者名 Miyamoto Tetsuya, Saitoh Yasuaki, Katane Masumi, Sekine Masae, Homma Hiroshi	4. 巻 369
2. 論文標題 YgeA is involved in L- and D-homoserine metabolism in Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnac096	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 -
1. 著者名 Miyamoto Tetsuya, Saitoh Yasuaki, Katane Masumi, Sekine Masae, Sakai-Kato Kumiko, Homma Hiroshi	4. 巻 86
2. 論文標題 Characterization of human cystathionine -lyase enzyme activities toward D-amino acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1536 ~ 1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac151	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 -

1. 著者名 Miyamoto Tetsuya, Moriya Toshiyuki, Katane Masumi, Saitoh Yasuaki, Sekine Masae, Sakai Kato Kumiko, Oshima Tairo, Homma Hiroshi	4. 巻 289
2. 論文標題 Identification of a novel D amino acid aminotransferase involved in D glutamate biosynthetic pathways in the hyperthermophile <i>Thermotoga maritima</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5933 ~ 5946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16452	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 -

1. 著者名 Miyamoto Tetsuya, Saitoh Yasuaki, Katane Masumi, Sekine Masae, Sakai Kato Kumiko, Homma Hiroshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Acetylornithine aminotransferase TM1785 performs multiple functions in the hyperthermophile <i>Thermotoga maritima</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2931-2941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14222	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 -

1. 著者名 Katane Masumi, Matsuda Satsuki, Saitoh Yasuaki, Miyamoto Tetsuya, Sekine Masae, Sakai Kato Kumiko, Homma Hiroshi	4. 巻 122
2. 論文標題 Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase regulates the free D aspartate level in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1639-1652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.30110	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 -

1. 著者名 Miyamoto Tetsuya, Katane Masumi, Saitoh Yasuaki, Sekine Masae, Sakai-Kato Kumiko, Homma Hiroshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Identification and biochemical characterization of threonine dehydratase from the hyperthermophile <i>Thermotoga maritima</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 903-915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-021-02993-x	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19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本哲也
2. 発表標題 細菌におけるD-アミノ酸代謝経路の解明と多機能型アミノ酸代謝酵素の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本哲也、伏信進矢、齋藤康昭、関根正恵、片根真澄、加藤くみ子、本間 浩
2. 発表標題 SHMTにおける新規D-セリン分解活性の発見
3. 学会等名 第17回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本哲也、齋藤康昭、関根正恵、片根真澄、加藤くみ子
2. 発表標題 超好熱菌由来O-アセチルホモセリンスルフヒドラーゼは複数の酵素活性を有する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本哲也
2. 発表標題 細菌におけるD-アミノ酸代謝経路の解明と多機能型アミノ酸代謝酵素の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本哲也
2. 発表標題 超好熱菌における多機能型アミノ酸代謝酵素
3. 学会等名 第47回白金シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本哲也、齋藤康昭、関根正恵、片根真澄、加藤くみ子
2. 発表標題 超好熱菌 <i>Thermotoga maritima</i> の O-アセチルホモセリンスルフヒドラーゼの D-アミノ酸代謝能の解析
3. 学会等名 第23回 極限環境生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本哲也、森屋利幸、片根真澄、齋藤康昭、関根正恵、大島泰郎、本間 浩、加藤くみ子
2. 発表標題 超好熱菌 <i>Thermotoga maritima</i> における D-グルタミン酸合成に寄与する新規 D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの同定及び機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本哲也、齋藤康昭、片根真澄、関根正恵、本間 浩、加藤くみ子
2. 発表標題 超好熱菌 <i>Thermotoga maritima</i> における多機能型アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼの同定及び機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本哲也、齋藤康昭、片根真澄、関根正恵、本間 浩、加藤くみ子
2. 発表標題 超好熱菌Thermotoga maritimaにおけるD-アミノ酸代謝酵素の探索
3. 学会等名 第16回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2021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