

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750150

研究課題名（和文） アーキアにおける新規AMP再利用経路の全容解明

研究課題名（英文） Functional elucidation of the AMP metabolic pathway in Archaea

研究代表者

佐藤 喬章（SATO TAKAAKI）

京都大学大学院・工学研究科・助教

研究者番号：60571411

研究成果の概要（和文）：

アーキアにおける AMP 再利用経路の生理的意義の解明を目指して本代謝経路を構成するタンパク質の生化学的および結晶構造解析を中心に研究を進め、本代謝経路が AMP に加え CMP および UMP も基質とできること、AMP や ADP によって活性化されること等を明らかにした。これらのことから、本経路は細胞外のヌクレオチド資化や、低エネルギー状態で AMP/CMP/UMP の分解を介したエネルギー産生に関与する可能性等が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the function of an archaeal AMP metabolic pathway, biochemical and structural analyses of enzymes composing the pathway were performed. The results revealed that the AMP metabolic pathway is dramatically activated by AMP and ADP and degrades not only AMP but also CMP and UMP. These results suggested that the physiological functions of this pathway may be involved in the assimilation of extracellular nucleotides and/or in salvaging energy from AMP/CMP/UMP when intracellular energy levels are low, and AMP/ADP concentrations are relatively high.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：アーキア、微生物代謝、ペントース代謝、AMP、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

生物は系統的に真核生物、細菌、アーキアの3種に大別される。アーキアは高温、高塩濃度、酸性などといった極限環境下で生育する微生物を多く含み、真核生物や細菌とは異なる独特な代謝経路や酵素を有している

ことから大変興味深い研究対象と言える。我々はアーキアの一種で 85℃を至適生育温度とする超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* について研究を行っている。これまでに新規酵素である AMP phosphorylase (AMPpase) および ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15Pi) を発見し、これらが生体内

での機能が未知であった Type III Rubisco と共に新しい代謝経路 (AMP 再利用経路) を形成していることを明らかにした (*Science*, (2007) 315: 1003-1006)。AMP 再利用経路は AMP を分解して中央糖代謝の中間代謝産物である 3-phosphoglycerate に変換することができる。本経路は酵素反応上は成立しているが、細胞内でどのような役割を果しているかは未だ不明である。

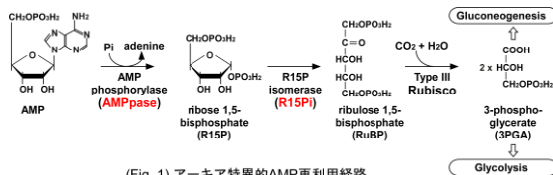
2. 研究の目的

本研究では **AMP 再利用経路の生理的機能の解明を目的**とした。また出発物質である **AMP の供給経路の同定や本経路と関連する他の代謝経路の有無**も検討し、AMP 再利用経路の包括的理解も視野に入れて研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 研究題材について

本研究では遺伝子操作系およびトランスクリプトーム技術が開発されている超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を研究題材として用いた。本菌を含めゲノムが解読されているアーキアの内約 3 分の 1 は以下に示すような AMP 再利用経路を有していると考えられる。



(Fig. 1) アーキア特異的AMP再利用経路

(1) AMP 再利用経路関連遺伝子の探索

AMP 再利用経路と繋がる代謝経路があるかどうか？またあるとしてどの遺伝子により構成されているのかを調べるために以下の 2 つの解析を行った。

① ゲノム情報の解析

公開されているゲノム情報 (UCSC ARCHAEAL GENOME BROWSER: <http://archaea.ucsc.edu/>, NCBI BLAST: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi, Entrez-Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed> など) を利用して、AMP 再利用経路を有するアーキアに特異的に分布する遺伝子の探索、および AMP 再利用経路を構成する遺伝子とオペロンを形成する遺伝子の解析を行った。

② トランスクリプトーム解析

アデノシン・グアノシン・シチジン・ウリジンの 4 種のヌクレオシドを培地に添加す

ると AMP 再利用経路の構成遺伝子である R15Pi および Rubisco の転写量が上昇することが当研究室において明らかになっている。これらのヌクレオシドを添加した培地で *T. kodakarensis* を培養し、DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析により AMP 再利用経路遺伝子と同調して転写量が変動する遺伝子を探索した。

(2) AMP 再利用経路構成遺伝子および関連遺伝子候補の *in vitro* 解析

AMP 再利用経路を構成する AMPpase および R15Pi の組換え型タンパク質について活性化物質探索や基質特異性の検討などの生化学的解析を行い、本代謝経路の生理学的役割について検討を行った。また上記(1)において選抜した候補について基質特異性検討などの生化学的解析を行い、AMP 再利用経路との関連を検証した。

(3) Western blot による AMP 再利用経路構成遺伝子の発現量の解析

各ヌクレオシドを単独で添加した培地で *T. kodakarensis* を培養し、無細胞抽出液を抽出した。その無細胞抽出液を SDS-PAGE で泳動分離した後、AMP 再利用経路を構成している AMPpase, R15Pi および Rubisco の各タンパク質に対する抗体を用いて Western blot を行い、各タンパク質の発現量を調べた。

(4) 各遺伝子破壊株の作製方法

相同的組換えを利用して遺伝子破壊株の作製を行った。 *trpE* をあらかじめ破壊した KW128 株を宿主とし、選択マーカー *trpE* 遺伝子 (anthranilate synthase 遺伝子) を標的遺伝子内部に挿入する手法で遺伝子を破壊した (*Appl. Environ. Microbiol.*, (2005) 71: 3889-3899)。

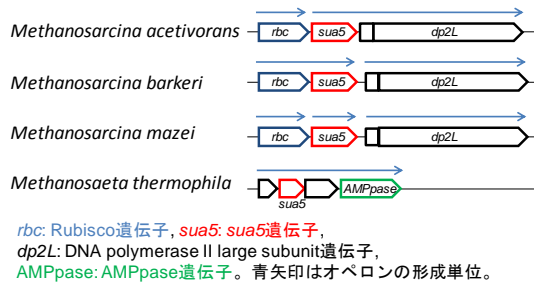
4. 研究成果

(1) AMP 再利用経路関連遺伝子候補の探索

① ゲノム情報の解析

まずゲノム情報解析により AMP 再利用経路を有するアーキア特異的な遺伝子を探索したがそのような遺伝子は見つからなかった。一方、AMP 再利用経路構成遺伝子とオペロンを形成する遺伝子を調べた結果、AMP 再利用経路を構成する別々の遺伝子とオペロンを形成していて、本経路と関連している可能性のある遺伝子を見出した。具体的には翻訳因子と推定されている *sua5* という遺伝子がメタン生成アーキア *Methanosarcina barkeri* において Rubisco とオペロンを形成しており、*Methanosarcina mazei* および *Methanosarcina acetivorans* においてもそ

これらの遺伝子同士が隣接して存在していた (Fig. 2)。一方、*Methanosaeta thermophila* において *sua5* は AMPase 遺伝子とオペロンを形成していた。アーキアにおける *sua5* の機能は全く分かっていないが、*Sulfolobus tokodaii* の Sua5 が ATP を分解して AMP を産生することが報告されている (*Proteins*, (2008) 70: 1108-1111)。これらのことから *sua5* と AMP 再利用経路が関連した機能を担っている可能性が十分考えられ、*sua5* が産生した AMP を特に本再利用経路が代謝している可能性等もある。今後 *sua5* の機能解析を行っていく予定である。



(Fig. 2) AMP 再利用経路の遺伝子とオペロンを形成する *sua5* 遺伝子

②トランスクリプトーム解析

ヌクレオシド添加培地において AMP 再利用経路と同調して活性化される遺伝子をトランスクリプトーム解析により網羅的に探索した。その結果、ribokinase family という大まかな機能だけが推定されている TK2285 遺伝子が見出された。アデノシンをリン酸化して AMP を産生するアデノシンキナーゼもこの ribokinase に分類されることから、この TK2285 を AMP 再利用経路関連遺伝子の候補として選抜した。

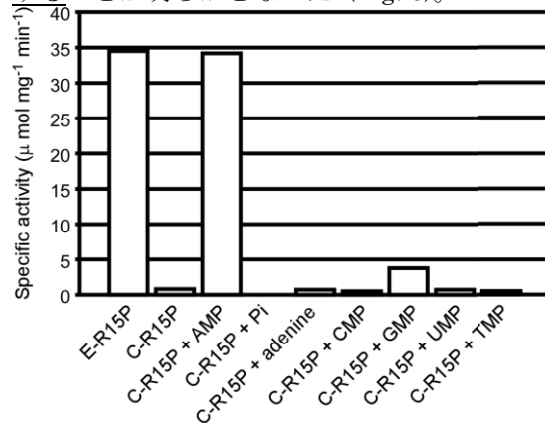
(2) AMP 再利用経路構成遺伝子および関連遺伝子候補の *in vitro* 解析

AMP 再利用経路を構成する AMPase および R15Pi に加え、上記で同定した TK2285 の組換え型タンパク質の *in vitro* 解析を行った。

① R15Pi の *in vitro* 解析

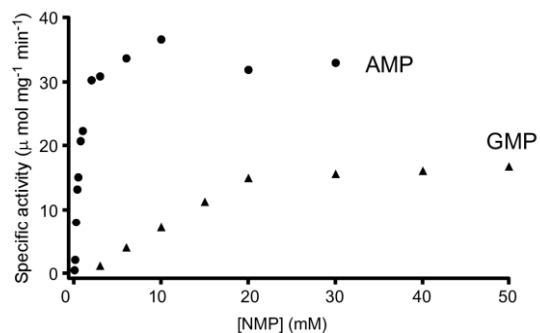
これまで R15Pi の基質である ribose-1,5-bisphosphate (R15P) を AMPase による酵素反応により調製していたが、今回詳細な生化学的解析を行うために化学合成した R15P を基質に用いた。ところが化学合成した R15P を用いると R15Pi の活性が著しく低下することが分かった (Fig. 3)。そこで AMPase 酵素反応溶液中に R15Pi を活性化している化合物があると考え、検討を行った。R15Pi 反応系に AMPase 反応溶液中に含ま

れる、AMP, adenosine および Pi を添加してみたところ、AMP が R15Pi を劇的に活性化することが明らかとなった (Fig. 3)。



E-R15P:酵素合成R15P, C-R15P:化学合成R15P, (Fig. 3) R15Pi を活性化する化合物の探索

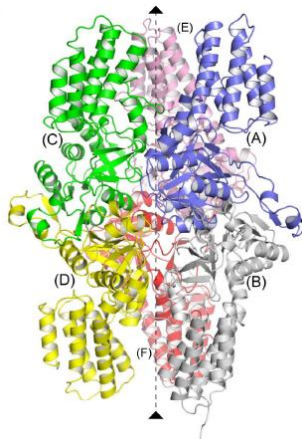
また AMP と同じヌクレオチドモノリン酸である CMP, GMP, UMP, TMP についても検討を行ったところ、GMP もわずかに活性化能を示した (Fig. 3)。しかし、その活性化能は AMP と比べると低く (Fig. 4)、また生体内における GMP 濃度は AMP より低いと考えられることから、生体内における活性化物質は主に AMP だと考えられる。



(Fig. 4) AMP/GMP による R15Pi の活性化

さらに、京都大学理学研究科の三木研究室と共同で R15Pi の 6 量体結晶構造を明らかにした (次ページ Fig. 5)。

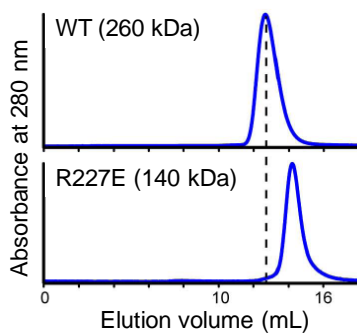
結晶構造から活性中心残基を Cys133 および Asp202 と予測し、それらの残基に変異を導入した R15Pi を作製し、生化学的解析を行った。その結果、これらの変異体からは活性が検出されず (Table 1)、Cys133 および Asp202 残基が活性中心残基であると同定できた。また 6 量体を形成残基と考えられた Arg227 に変異を導入したところ、6 量体構造が崩れた上に (Fig. 6)、活性も大きく低下した (Table 1)。このことから 6 量体構造も R15Pi 活性に重要である可能性が示唆された。



(Fig. 5) R15Pi の結晶構造

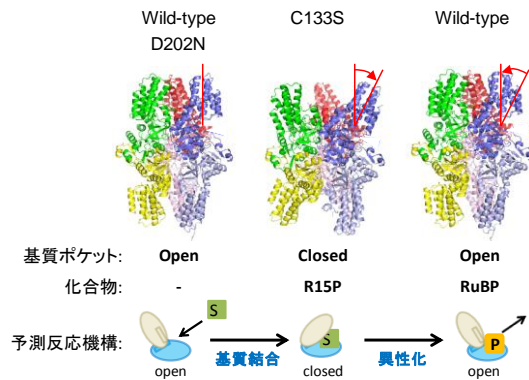
Table 1. R15Pi 変異体の R15Pi 活性

<i>Tk</i> -R15Pi	Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
WT	29.3 ± 2.1
C133S	< 0.1
C133A	< 0.1
D202N	< 0.1
R227E	0.5 ± 0.2



(Fig. 6) R227E 変異体の分子量変化

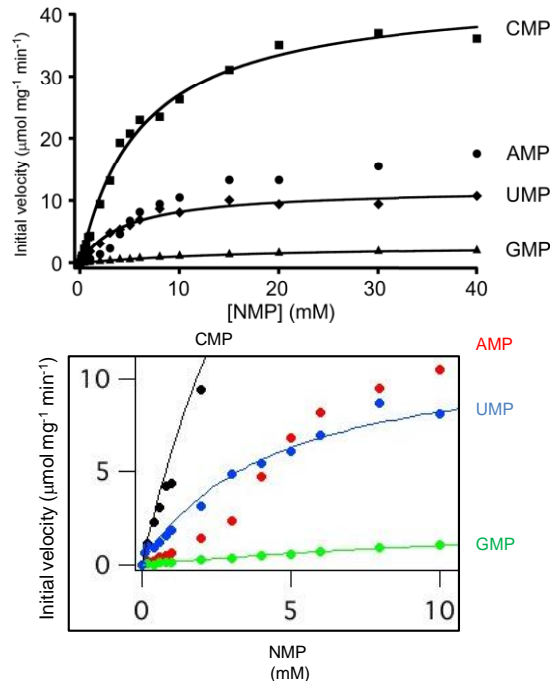
さらに、野生型および各変異体の基質や生成物との共結晶構造を解析し、基質の結合により R15Pi の構造が反応を進めやすい形に変化することを明らかにした。具体的には、基質が結合する前の R15Pi の基質ポケットは開いた状態で (Fig. 7 左)、基質が結合すると閉じた構造となり (Fig. 7 中央) 活性残基の配向を最適化すると同時に触媒部位を溶媒から遮蔽することにより反応を進めやすくしていると考えられた。さらに、生成物ができるとまた開いた構造にもどる (Fig. 7 右) ことが明らかとなった。また、D202N 変異体には基質が結合せず野生型の基質なしの構造と同様であったことおよび C133S 変異体には基質が結合するものの生成物に変換されず基質のまま残っていたことから、C133 は触媒残基、D202 は基質結合残基であることが予測された (J. Biol. Chem. (in press))。



(Fig. 7) R15Pi の結晶構造変化

②AMPpase の *in vitro* 解析

これまで AMPpase は AMP のみを基質とすると考えてきた。しかし上述のように R15Pi が AMP により活性化されることが本研究により明らかとなった。これまでの AMPpase の活性測定では R15Pi をカップリング酵素として用いてきたが、AMP による活性化は特に行っていない。よって、AMP 以外の基質にも AMPpase が活性を有していることを見落としていた可能性があった。そこで、AMP によって活性化した状態の R15Pi をカップリング酵素として用いて AMPpase の基質特異性の再検討を行った。その結果、AMPpase は AMP に加え CMP, UMP, および GMP も基質とすることが明らかとなった (Fig. 8 上)。活性化能や細胞内での濃度を考慮すると AMPpase は主に AMP, CMP, および UMP を基質としている可能性が考えられる。

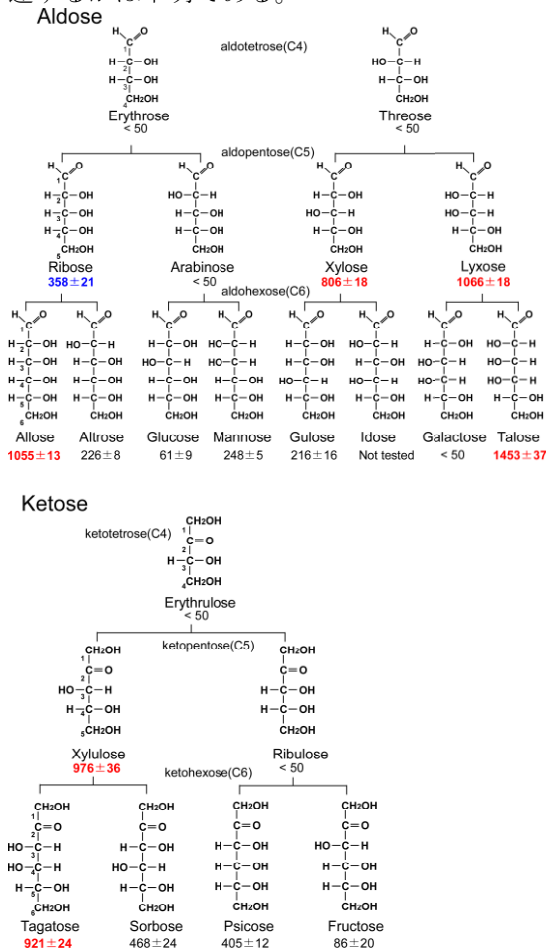


(Fig. 8) AMPpase の基質特異性の検討

また、CMP や UMP に関しては[S]-vプロットがミカエリスメンテン型の挙動を示したのに対し、AMP に対してはミカエリスメンテン型の曲線にはならず、低濃度では活性が低く高濃度になると活性が徐々に上昇するアロステリック作用を示すことが明らかとなった (Fig. 8 下)。

③TK2285 の基質特異性の検討

AMP 再利用経路が活性化される条件で同調して活性化される TK2285 の基質特異性を検討した。アデノシンに対して活性を示せば AMP を生成することからアデノシンキナーゼである可能性も考えたが、実際はアデノシンに対してはキナーゼ活性を示さず、幅広い単糖に対してキナーゼ活性を示すことが明らかとなった (Fig. 9)。特にキシロースやキシルロースなどペントースに対する活性を示したことから AMP 再利用経路と関連している可能性はあるが、今のところどのように関連するかは不明である。

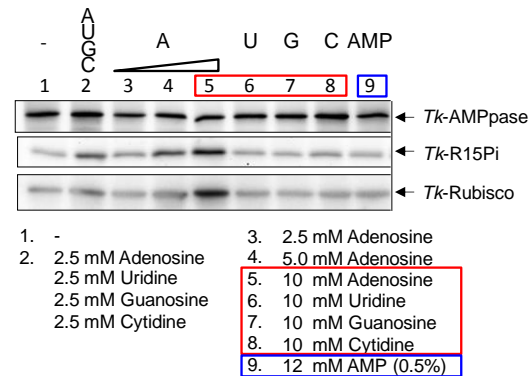


(Fig. 9) TK2285 の基質特異性の検討 (化合物下の数値は比活性値を示し単位は $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 。比較的大きい比活性値は赤字で示した。)

(3) AMP 再利用経路構成遺伝子の *in vivo* 機能解析

①Western blot による解析

上記のように4種のヌクレオシド存在下でAMP 再利用経路の転写が上昇することが分かっていたが、4種の内、どのヌクレオシドが影響を与えているかを Western blot により解析した。その結果、アデノシンが特に R15Pi および Rubisco を活性化していることを明らかにした (Fig. 10)。また、アデノシン単独添加培地で培養した菌体から抽出した RNA を用いたトランスクリプトーム解析においても同様の傾向が見られた。



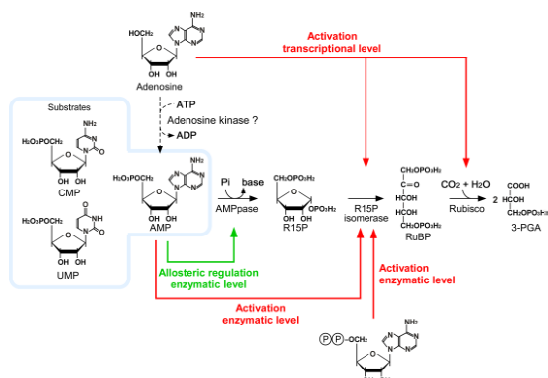
(Fig. 10) 各ヌクレオシドが AMP 再利用経路構成遺伝子の発現にあたる影響の解析

2. 遺伝子破壊株の作製

AMPase, R15Pi および Rubisco 遺伝子の破壊株を作製した。これにより AMP 再利用経路構成遺伝子と分かっている遺伝子については全て破壊株が準備できた。現在、これらの破壊株について増殖特性などの *in vivo* 解析を行っているところである。また、TK2285 遺伝子の破壊株も作製中である。

これまでの研究により明らかにした AMP 再利用経路の模式図を(次ページ Fig. 11)にまとめた。

AMP や ADP などによって制御を受けており、AMP/CMP/UMP といったヌクレオチドを代謝できることが明らかとなった。また、アデノシンにより R15Pi および Rubisco が活性化されたことから adenosine kinase の存在も考えられる。アーキアには既知の adenosine kinase と相同性を示す遺伝子は見つかっていないことから、新規構造のタンパク質が存在する可能性も考えられる。今後、新規 adenosine kinase の探索も視野に入れて研究を進めていきたい。



(Fig. 11) AMP 再利用経路の模式図

本研究の成果から AMP 再利用経路の生理学的役割については外部から取り込んだ NMP を資化している可能性や AMP/ADP 濃度が高い低エネルギー状態などで細胞内のヌクレオシドモノリン酸を糖代謝の中間産物に分解しエネルギーを取り出している可能性等が示唆された。

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)

1. Akira Nakamura, Masahiro Fujihashi, Riku Aono, Takaaki Sato, Yosuke Nishiba, Shosuke Yoshida, Ayumu Yano, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Dynamic, ligand-dependent conformational change triggers the reaction of ribose-1,5-bisphosphate isomerase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print] 2012, 査読有り (DOI: 10.1074/jbc.M112.349423)

2. Haruyuki Atomi, Takaaki Sato and Tamotsu Kanai, “Application of Hyperthermophiles and their Enzymes”, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, No. 5, pp. 618-626, 2011, 査読あり (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.010)

3. Takaaki Sato and Haruyuki Atomi, “Novel Metabolic Pathways in *Archaea*”, *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, No. 3, pp. 307–314, 2011, 査読あり (DOI: 10.1016/j.mib.2011.04.014)

[学会発表] (計 5 件)

1. 佐藤喬章、青野陸、中村顕、西谷優一、藤橋雅宏、矢野歩、吉田昭介、今中忠行、三木邦夫、跡見晴幸、“*Archaea* 特異的 AMP 代謝経路の生理的機能の解明”、極限環境生物学会、長崎大学 坂本キャンパス 1 良順会館、2011 年 11 月 28 日。

2. Takaaki Sato, Riku Aono, Akira Nakamura, Yuichi Nishitani, Masahiro Fujihashi, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Tadayuki Imanaka, Kunio Miki, and Haruyuki Atomi, “Novel enzymes involved in pentose metabolism in the *Archaea*”, Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, 2011 September 14, Toyama, Japan.

3. Takaaki Sato, “Unique metabolism involving archaeal Rubiscos”, Wageningen University and Research Centre/Kyoto University Joint Workshop, 2011 April 26, Kyoto, Japan.

4. 佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、“超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるペントース代謝の解析”、極限環境生物学会、京都大学 宇治キャンパスおうばくプラザ、2010 年 11 月 16 日。

5. Takaaki Sato, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “Studies on a novel AMP metabolic pathway in *Archaea*”, 8th Extremophiles, 2010 September 14, Ponta Delgada, Azores, Portugal.

[図書] (計 2 件)

1. Takaaki Sato, and Haruyuki Atomi “Microbial inorganic carbon fixation” *Encyclopedia of Life Sciences* (2010) 1-12 DOI: 10.1002/9780470015902.a0021900

2. “超好熱菌ゲノム情報に基づいた新規代謝酵素・経路の解明” 跡見晴幸、佐藤喬章、横大路裕介、今中忠行 酵素利用技術大系、第 5 編 第 5 章 第 2 節、510-517, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 喬章 (SATO TAKAAKI)

京都大学大学院・工学研究科・助教

研究者番号：60571411