

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 6月 1日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780084

研究課題名（和文） 好熱菌におけるロイシンシグナリングの分子機構・構造基盤の解析

研究課題名（英文） Mechanism of leucine signaling of *Thermus thermophilus*

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（和文）：好熱菌 *Thermus thermophilus* において炭素・窒素代謝の連結反応を担うグルタミン酸脱水素酵素(GDH)が GdhA サブユニットと GdhB サブユニットから構成され、ロイシンによりアロステリックな活性化を受けることを明らかにした。さらに、GDH の結晶構造を高分解能で決定することに成功し、ロイシンによる調節の構造基盤を明らかにした。ヒト由来 GDH2 の部位特異的変異体の解析から、ヒト由来 GDH のロイシンによるアロステリック調節機構が *T. thermophilus* 由来の GDH における機構と類似している可能性を示唆した。また、*T. thermophilus* の遺伝子発現の網羅的解析によりロイシンをシグナルとするグローバルな転写調節機構が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We revealed that glutamate dehydrogenase (GDH) from *Thermus thermophilus* formed hetero-hexameric structure consisted from homologous two subunits; catalytic subunit (GdhB) and regulatory subunit (GdhA), and this complex was subject to allosteric activation by hydrophobic amino acids especially leucine. We succeeded to determine the crystal structure of GdhA/GdhB/Leu complex and revealed the allosteric mechanism of GDH. GDH2 from human (hGDH2) is also subject to allosteric activation by leucine and we found that important residues for binding of leucine were conserved in hGDH2. The mutational analyses of hGDH2 revealed that hGDH2 was also allosterically activated by leucine with a similar manner with GDH from *T. thermophilus*.

We also performed comprehensive analysis of gene regulation by means of DNA microarray technique and suggested that leucine was a signal of global regulation in *T. thermophilus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：好熱菌、グルタミン酸脱水素酵素、アロステリック調節、グローバル調節

1. 研究開始当初の背景

分岐鎖アミノ酸をはじめとしたアミノ酸は

生体調節因子として注目を集めていた。ヒトにおけるアミノ酸の調節因子としての機能として、ロイシンによる GDH の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) を介したロイシンによるタンパク質合成の促進などの機構が明らかにされつつあり、ロイシンは機能性食品や薬剤の1つとしての利用もされ始めていた。

一方、他の動物や植物、バクテリアにおいてもアミノ酸シグナルに関する報告があり、その機構の解明および代謝中枢の改変は、植物においては生産効率の促進、微生物においては医薬品を含めた様々な物質の効率的な発行生産の基盤へとつながることが期待された。

バクテリアにおいてはロイシンシグナル応答に関わる因子として Lrp (Leucine-responsive protein) が知られていた。詳細に研究されている大腸菌 Lrp はロイシン生合成経路酵素遺伝子の転写調節を担うほか、グルタミン合成酵素や別のアミノ酸の代謝酵素、グルタミン酸脱水素酵素の転写調節を行うことが明らかになっていた。

2. 研究の目的

我々は、高温発酵の宿主としての潜在性を有する高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において炭素一窒素代謝の中枢を担うグルタミン酸脱水素酵素(GDH)がバクテリアとしては初めてロイシンにより活性化を受けることを見出し、酵素のアロステリック調節機構に関する研究を進めてきた。本研究課題では、GDH とロイシン複合体の結晶構造解析を行うことによって、その詳細な構造基盤を明らかにし、ヒト由来 GDH のロイシンによる活性化機構との共通部分、相違点を明らかにすることを試みた。また、*T. thermophilus* を用いた転写調節の網羅的解析を行い、ロイシンによる転写調節を受けるターゲット遺伝子の同定やその調節機構の解析を行うことによって、ロイシンシグナルの生理的意義を解明することも目指した。

3. 研究の方法

①グルタミン酸脱水素酵素のアロステリック調節機構の解析

(1) GDH のアロステリック調節機構の解析

GdhA サブユニット、GdhB サブユニットおよび GdhA/GdhB ヘテロ複合体の組換えタンパク質を大腸菌に発現させ、熱処理後、 Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。調整した酵素溶液を用いて活性測定を行った。

GdhA/GdhB の活性測定は NADH の NAD^+ への変換を 340 nm の吸収の減少を分光光度計を用いて追跡することにより行った。2-オ

キソグルタル酸および塩化アンモニウム、NADH、リン酸バッファーを含む反応溶液を調製し、温度一定になるまでインキュベートした後、GDH 酵素溶液を添加することにより反応を開始した。様々な濃度のロイシンを反応溶液に添加しておいた系列を準備することによってロイシンに対する応答を調べた。このような活性測定を GdhA, GdhB, GdhA/GdhB の野生型酵素および GdhA に Y38S, I71T, A72D, R134A, D166A の変異を導入した各ヘテロ複合体酵素について行った。GdhA/GdhB ヘテロ複合体については 2-OG, NADH, NH_4^+ および Glu, NAD^+ 存在下での酵素動力学的解析を行った。

T. thermophilus におけるヘテロ複合体の形成を調べるために、GdhB の C 末端に his-tag を融合させたタンパク質を発現させるような組換え株を作製し、 Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製後、抗 GdhA 抗体、抗 GdhB 抗体を用いた western blotting 解析を行った。

(2) GdhA/GdhB/Leu 複合体の結晶構造解析

GdhA サブユニットと GdhB サブユニットの組換えタンパク質を大腸菌に大量発現させ、熱処理後、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、純品となるまで精製した。精製の間 10 mM ロイシンを常にバッファーに添加した。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得て、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得た。我々のグループが既に決定していた *T. thermophilus* 由来の GdhA および GdhB ホモオリゴマー構造の結晶構造をモデルとして分子置換法により GdhA/GdhB/Leu 複合体の結晶構造を決定し、その後モデル精密化を行い、最終構造とした。

(3) GdhB/Glu 複合体の結晶構造解析

GdhB サブユニットの組換えタンパク質を大腸菌に発現させ、熱処理後、 Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、純品となるまで精製した。精製の間 10 mM グルタミン酸を常にバッファーに添加した。結晶が得られる条件を最適化し、良質な結晶を得て、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 2.1 Å 分解能の回折データを得た。*Thermotoga maritima* 由来の GDH の結晶構造をモデルとして分子置換法により GdhB/Glu 複合体の結晶構造を決定し、その後モデル精密化を行い、最終構造とした。

(4) ヒト由来 GDH とその改変酵素のロイシンによる活性化の解析

GDH の活性測定は NADH の NAD^+ への変換を 340 nm の吸収の減少を分光光度計を用

いて追跡することにより行った。2-オキソグルタル酸および塩化アンモニウム、NADH、リン酸バッファーを含む反応溶液を調製し、温度一定になるまでインキュベートした後、GDH 酵素溶液を添加することにより反応を開始した。様々な濃度のロイシンを反応溶液に添加しておいた系列を準備することによってロイシンに対する応答を調べた。

このような活性測定を hGDH2 野生型酵素および R151M, D185 変異体について行った。hGDH2 遺伝子はヒト脳由来 cDNA より PCR により増幅後クローニングし、発現ベクター pHIS8 へ連結後、プラスミドを大腸菌にて発現させ、Ni²⁺アフィニティー精製により酵素溶液を調製した。各変異体の発現プラスミドは野生型酵素の発現プラスミドに対し部位特異的変異を導入することにより調製した。

(5) *T. thermophilus* におけるロイシンに応答した遺伝子の転写変動の網羅的解析

ロイシンがすべての遺伝子の発現にどのような影響を及ぼすのか調べるため、1 mM のロイシンを最少培地に添加した際の影響を DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、ロイシンによりもっとも顕著な転写レベルの上昇が観察された遺伝子 *ilvE* (TTC1870) の隣に *LysR* family 転写調節因子 (TTC1871) が存在していたため、これをロイシンによるシグナル伝達を担う因子の候補とし、その詳細な解析を行った。まず、TTC1871 遺伝子破壊株を作製し、野生株との比較を行った。次に、TTC1871 の結合部位を特定するために複数の DNA プローブを作製し、大腸菌を宿主として発現させた組換え TTC1871 タンパク質を用い、EMSA を行うことでその結合箇所を調べた。その結果、TTC1871 は自身の遺伝子上流に結合することがわかったため、その DNase I フットプリンティング法により結合配列の同定を行った。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸脱水素酵素におけるロイシンによるアロステリック調節機構の分子基盤の解析

T. thermophilus はゲノム上に互いに 46% のアミノ酸配列の相同性を有する 2 つの GDH ホモログ (GdhA, GdhB) をコードする遺伝子が並んで存在している。それぞれの組換えタンパク質を用い、活性測定した結果、GdhB は GDH 活性を有しているのに対し、GdhA は GDH 活性をはじめとしたいかなる活性も示さない。GdhB の活性は、以前に我々が解析していた *T. thermophilus* から部分精製した native GDH と反応方向性が異なっていたことから、GdhB は単独では機能せず何らかの調節因子が存在すると考えられた。そこで、

GdhA と GdhB を共発現させ精製したところ、GdhA と GdhB がヘテロ複合体を形成し、このヘテロ複合体は native GDH とよく似た活性のプロファイルを示すことが明らかになった。主に哺乳類等で知られている様々なアロステリックエフェクターを添加した条件で活性測定を行った結果、GdhA/GdhB 複合体はロイシンをはじめとした疎水性アミノ酸や芳香族アミノ酸によって活性化を受けることがわかった。この活性化は GdhB 単独の酵素では観察されなかったため、エフェクターは GdhA 内部か GdhA と GdhB の間の領域に結合すると考えられた。そこで GdhA を活性調節サブユニット、GdhB を触媒サブユニットと名付けた。ロイシン存在下、非存在下で動力学的パラメーターを測定した結果、ロイシンは基質や補酵素に対する親和性には大きな影響を与えず、主に酵素の回転数を上昇させるのに寄与していることが分かった。活性調節機構を調べるために決定した GdhA/GdhB/Leu 複合体の結晶構造では GDH は 2 つの GdhB と 4 つの GdhA から構成されるヘテロ 6 量体構造を形成していた (図 1 a)。

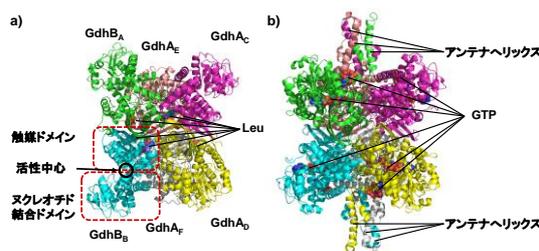


図1 a) *T. thermophilus* GdhA/GdhB/Leu, b) bovine GDH

ロイシンはサブユニット間領域に計 6 つ結合し、特異的な相互作用により認識されており (図 2 a)、結合サイトを形成するいくつかのアミノ酸残基に変異を導入した酵素はロイシンの感受性が大きく低下したことから、この結合サイトが活性化に主要な役割を担っていることが示唆された。以上の結果から GDH のアロステリック結合サイトにロイシンが結合することで酵素の回転数が上昇し活性化が起こる機構が提示された。

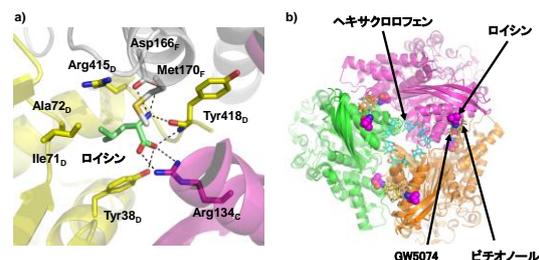


図2

ウシ GDH の GTP との複合体構造から GTP による阻害は哺乳類由来 GDH のみが有しているアンテナヘリックスと軸ヘリックスを介して触媒ドメインとヌクレオチド結合ドメインが閉じた形に固定されることによることが分かっていた。ヒト GDH も同様の機構で阻害を受けると考えられているが、ロイシンによる活性化機構は不明のままであった。*T. thermophilus* やヒトをはじめとした GDH のアミノ酸配列を比較した結果、驚くべきことにロイシンの主鎖部分を認識する Arg, Asp 残基が他のバクテリアや植物では保存されていないが、ヒト GDH では保存されていた。これらの保存アミノ酸をロイシンが結合できなくなるように置換したヒト GDH2 の変異酵素を作製し、ロイシンに対する感受性を調べたところ、変異酵素はロイシンによる活性化能を消失していることが分かった。この結果からヒト GDH でも *T. thermophilus* の GDH と同様のロイシン結合サイトが存在することが示された。GDH 活性の脱制御を与える変異のいくつかは HI/HA (hyperinsulinism/hyperammonemia) 血症の原因とされており、ロイシンに対する高感受性が示唆されている。最近、ウシ GDH の阻害剤がケミカルライブラリーを用いたハイスクリーンングにより得られ、特に強い阻害活性を示した hexachlorophene1 や GW5074、Bithionol などの化合物との複合体の結晶構造が決定された。これらも同じサブユニット間領域に結合し、特に GW5074 や Bithionol はロイシンが結合するサイトのごく近傍に結合する (図 2b)。これらの阻害剤は GDH の回転数を低下させることからサブユニット間領域に結合する化合物がドメインの開閉を調節するという共通した性質を見出すことができた。このような知見を踏まえ、GDH の阻害剤の設計が促進されることが期待される。

(2)ロイシンによるグローバルな転写調節機構の解析

DNA マイクロアレイにより 1 mM ロイシンを添加して 1 時間後の遺伝子の転写レベルの違いを DNA マイクロアレイにより解析した結果、141 個の遺伝子が 1.5 倍以上の転写量増加、116 個の遺伝子が減少を示した。電子伝達系を中心としたエネルギー生産システムやタンパク質合成を担うリボソームタンパク質等で転写量増加がみられただけでなく複数のアミノ酸代謝系、ABC トランスポーター遺伝子においても転写量の増減が見られた。

ロイシン生合成の最後の反応を担う酵素であると同時に分解の初発酵素である分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子(TTC1870, *ilvE*)はロイシン添加により 6.2

倍の転写レベルの増加という最も顕著な変化を示した。TTC1871 の上流には LysR ファミリーに属する転写調節因子である TTC1871 が存在しており、*ilvE* の転写調節を担っていると同時にロイシンを介したグローバル調節を担う因子である可能性が考えられた。

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富田 武郎、西山 真 ロイシンによるグルタミン酸脱水素酵素の活性調節機構 化学 67 巻(2012) 査読無
- ②T. Tomita, T. Kuzuyama, M. Nishiyama. Structural basis for leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **286**, 37406-13 (2011) 査読有
- ③T. Tomita, T. Miyazaki, J. Miyazaki, T. Kuzuyama, M. Nishiyama. Hetero-oligomeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Microbiology* 156, 3801-13 (2010) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 富田武郎、葛山智久、西山真 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来グルタミン酸脱水素酵素のロイシンによるアロステリック調節機構の構造基盤 2011 年度日本農芸化学会大会 (京都) 2012 年 3 月
- ② 富田武郎、西山真 Mechanism for allosteric regulation of glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌) 2012 年 9 月
- ③ 富田武郎、西山真 Mechanism of leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会 (兵庫) 2011 年 8 月
- ④ 松下創、富田武郎、葛山智久、西山真 Leucine-mediated signal transduction in *Thermus thermophilus* 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会 (兵庫) 2011 年 8 月
- ⑤ 西山真、富田武郎 グルタミン酸脱水素酵素の新規活性調節機構の発見 2010 年度日本農芸化学会大会 (東京) 2011 年 3 月
- ⑥ 富田武郎、葛山智久、西山真 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の活性調節サブユニット GdhA の結晶構造解析 2010 年度日本農芸化学会大会 (東京) 2011 年 3 月
- ⑦ 富田武郎、西山真 Molecular mechanism for allosteric regulation of glutamate

dehydrogenase from *Thermus thermophilus*
高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第9
回連携研究会（兵庫）2010年8月

- ⑧ 富田武郎、西山真 Regulatory mechanism
of glutamate dehydrogenase from *Thermus*
thermophilus 2010 Annual meeting of
American Crystallographic Association
(ACA)（シカゴ）2010年7月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

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

なし

(3)連携研究者

なし