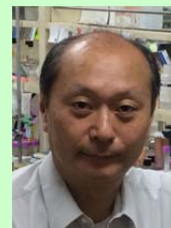


アミノ基修飾型キャリアタンパク質を介した物質変換機構の解明と応用展開  
Elucidation of mechanisms of biomaterial conversion mediated by amino group-modifying carrier protein and application



課題番号：24228001

西山 真 (NISHIYAMA MAKOTO)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究の概要

LysWは好熱菌のリジン生合成において基質を生合成酵素へ運搬する、アミノ基に結合する新しいタイプのキャリアタンパク質である。本研究は同タンパク質が各生合成酵素にどのように認識されるかを構造生物学的に解明すると共に、放線菌の二次代謝において同タンパク質のホモログが関わる新規の非天然型アミノ酸含有化合物の生合成経路を解明することを目指す。

研究分野：農学

キーワード：微生物代謝、酵素化学

1. 研究開始当初の背景

我々はアミノ基に結合する新規なキャリアタンパク質 LysW を見出した。同タンパク質のホモログはリジンやアルギニン生合成だけでなく、放線菌の二次代謝にまで広がって利用される可能性が見出された。LysW を介したシステムが生体物質変換系において重要な位置を占めていることが示唆されたことから、その物質変換機構の解明が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、LysW ホモログが関わる一次・二次代謝産物生合成システムを構造生物学、遺伝学、天然物化学、バイオインフォマティクスなどの最先端技術を駆使して解析し、LysW と各種代謝酵素群の認識や LysW ホモログが関わる代謝系、およびその制御の全容の解明を目指す。さらに、本研究では、得られる情報を基にして、有用物質生産系の基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では LysW ホモログがどのようにこれらのリジン・アルギニン生合成などのマシナリーに組み入れられ、一次代謝生合成に寄与しているのかを構造生物学的手法を取り入れることで分子レベル・原子レベルで明らかにする。

また放線菌の二次代謝生合成にも LysW およびそれに関連する酵素群のホモログが含まれる。本研究では、放線菌の LysW ホモログに着目し、これらがどのような二次代謝

産物の生合成に関わるのかを明らかにする。これらの研究により、アミノ基修飾に関わる LysW ホモログがどのようにして生合成機構に関与しているかを詳細に明らかになる。LysW ホモログあるいはその誘導体の分子・原子レベルでの認識機構を基盤として、アミノ酸や二次代謝産物の有用物質生産系確立といった研究の応用還元も視野に入れていきたいと考えている。

4. これまでの成果

好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成後半部の反応を触媒する LysZ、LysY、LysK について結晶構造解析を行った。本解析により、LysW 単体、LysZ・ADP 複合体、および LysZ・LysW 複合体の結晶構造の決定に成功した。LysW は Zinc finger ドメインを持つ球状ドメインと C 末端の伸張ドメインによって構成され、分子全体にわたって負に帯電していた。LysZ・LysW 複合体において、LysW は負に帯電した球状ドメインが LysZ の活性中心の付近の正に帯電した領域とイオン結合によって相互作用していることが明らかになった。

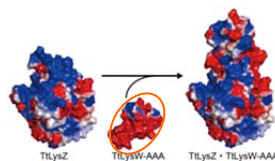
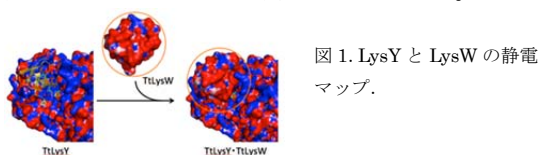


図1. LysZ と LysW の静電マップ。赤、青はそれぞれ、負、正に帯電していることを示す。

LysY についても LysW との複合体構造の決定に成功している。推測した通りに、LysW は自身の球状ドメインが LysZ の活

性中心の付近の正に帯電した領域と相互作用をしていることが明らかとなった。



これ以外に LysK のリジン複合体の結晶構造や、生合成前半部のホモイソクエン酸脱水素酵素のホモイソクエン酸、イソクエン酸複合体構造などの結晶構造を明らかにしている。その他、リジン生合成酵素遺伝子の転写制御にアルギニン生合成の転写因子が関わること、リジン生合成と密接に関連するリジン取込みに関わるタンパク質の構造および機能についても、リジンアナログのアミノエチルシステイン耐性株をきっかけに明らかにしている。

アーキアのリジン生合成はアルギニン生合成と深く関連があり、多機能酵素が連続する幾つかの反応を行うことが明らかとなった。*Sulfolobus* では最初の反応のみが基質特異性が異なり、*Thermococcus* では全てが同様に反応をした。どちらに置いても後半部初発酵素を LysW 複合体として結晶化することに成功している。

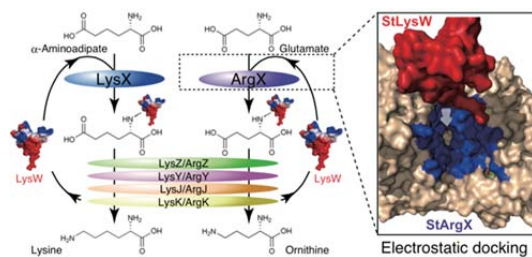


図 4. *Sulfolobus* におけるリジン・アルギニン生合成 (左図)と ArgX・LysW・グルタミン酸複合体結晶構造

放線菌における LysW ホモログを介した二次代謝生合成については、ある種の放線菌が DADH と略称される新規非天然アミノ酸を経ること、そしてそれが非リボソーム型ペプチド合成酵素などによって、アザビシクロ環化合物を経て最終的に Val-Pip と名付けたジペプチドを生成することなどを明らかにしている。

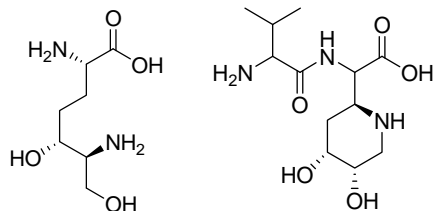


図 6. DADH(左)と Val-Pip(右)の化学構造

我々はこれとは若干違うタイプの LysW を有する放線菌と同菌の生合成クラスターも単離している。これらは、ある種の放線菌に共通の生物活性を有する化合物の生合成に関わっているものと推測している。

## 5. 今後の計画

LysW 複合体の結晶構造を決定できていない LysJ および LysK について引き続き結晶化スクリーニングを行うと共に、リジン・アルギニン生合成経路について結晶構造、基質特異性をベースに、進化の過程を考察する。

放線菌については、抗菌、抗がんなどの作用が期待されるアザビシクロ環生成機構を中心に DADH から最終産物への変換過程を解明する。LysW ホモログを介した新規な化合物群の生物活性を調べることで新たな有用物質の開拓に努め、そうした化合物の産生能増大を目指す。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Structural insight into amino group-carrier protein-mediated lysine biosynthesis: crystal structure of the LysZ•LysW complex from *Thermus thermophilus*. Ayako Yoshida, Takeo Tomita, Tsutomu Fujimura, Chiharu Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama, and Makoto Nishiyama. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 435-447 (2015)
2. Genome-wide comprehensive analysis of transcriptional regulation by ArgR in *Thermus thermophilus*. Naoki Iwanaga, Kaori Ide, Takeshi Nagashima, Takeo Tomita, Yoshihiro Agari, Akeo Shinkai, Seiki Kuramitsu, Mariko Okada-Hatakeyama, Tomohisa Kuzuyama, and Makoto Nishiyama. *Extremophiles*, **18**, 995-1008 (2014)
3. Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*. Takuya Ouchi, Takeo Tomita, Akira Horie, Ayako Yoshida, Kento Takahashi, Hiromi Nishida, Kerstin Lassak, Hikari Taka, Reiko Mineki, Tsutomu Fujimura, Saori Kosono, Chiharu Nishiyama, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu, Sonja-Verena Albers, Tomohisa Kuzuyama, and Makoto Nishiyama. *Nature Chemical Biology*, **9**, 277-283 (2013)
4. Two ATP-binding cassette transporters involved in (S)-2-aminoethyl-cysteine uptake in *Thermus thermophilus*. Yuko Kanemaru, Fumihito Hasebe, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, and Makoto Nishiyama. *Journal of Bacteriology*, **195**, 3845-3853 (2013)

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotec-res-ctr/saibo.ukinou/>