

アミノ酸生合成酵素の構造・機能・活性制御に関する基礎・応用研究

東京大学生物生産工学研究センター 西山 真



アミノ酸は、食品としてだけでなく、環境に優しい天然素材として、医療品や化粧品などに広く展開され利用されている。アミノ酸は生物の主要構成成分であり、アミノ酸を生合成するにはエネルギーを消費する。そのため、環境中にアミノ酸が豊富に存在する場合には、アミノ酸の生合成を抑制する転写レベルおよび酵素レベルの機構が存在する。アミノ酸の多くは微生物を用いて生産されており、アミノ酸生産性の向上のために、従来からランダム変異とスクリーニングによる微生物育種が行われてきた。このようにして育種されたアミノ酸生産株には多数の変異が導入されており、その中には酵素レベルの制御機構である初発酵素のフィードバック阻害が解除されているものが含まれている。しかしフィードバック阻害の機構については良くわかっていない例が多い。

微生物においてリジンの生合成経路は2種類見出されている。1つは従来から知られているジアミノピメリン酸(DAP)を経由するDAP経路であり、もう1つは最近我々が好熱菌で発見した α アミノアジピン酸(AAA)経路である。DAP経路では、経路の初発酵素でアスパラギン酸をリン酸化するアスパラギン酸キナーゼ(AK)が最終産物によりフィードバック阻害を受ける。一方、AAA経路においては、経路の初発酵素で2-オキソグルタル酸とアセチルCoAを縮合しホモクエン酸を合成するホモクエン酸合成酵素(HCS)がリジンによって制御される。我々はX線結晶構造解析の手法を用いて両酵素の構造機能相関を解析している。本発表では明らかになりつつあるAKおよびHCSの活性制御のメカニズムについて紹介する。

1) *Corynebacterium glutamicum*由来のAKの活性制御機構

*C. glutamicum*はグルタミン酸、リジンをはじめ数多くのアミノ酸発酵菌として用いられている。同菌はリジンとスレオニンが同時に存在する時のみフィードバック阻害を受けるAK(CgAK)を有している。AKにはホモダイマーのものと $\alpha_2\beta_2$ ヘテロテトラマー型の2種類が存在している。ホモダイマー型AKがN末側に触媒ドメイン、C末側に活性制御ドメインを有する一方、 $\alpha_2\beta_2$ 型AKは、ホモダイマー型AKと同様なドメイン構造を持つ α サブユニットと、 α サブユニットのC末端領域の活性制御ドメインと全く同じ配列を持つ β サブユニットの2種類のサブユニットから構成されている。これまでに結晶構造が明らかになっているのはホモダイマーのAKだけであった。そこで我々は、 $\alpha_2\beta_2$ 型構造を有し、リジン醗酵の鍵酵素といえるCgAKについて、活性制御ドメインの結晶構造、 $\alpha_2\beta_2$ を有する活性型酵素の全長の結晶構造、リジンとスレオニンを結合した不活性型酵素の結晶構造、リジンアナログであるアミノエチルシステイン(AEC)耐性を示す変異型酵素のリジン+スレオニン複合体構造を決定し、活性制御機構を解析した。

ホモダイマー型酵素では2量体の形成は活性制御ドメイン間の相互作用によるが、 $\alpha_2\beta_2$ 型構造を有するCgAKではホモダイマー型酵素の相互作用に相当する α サブユニット中の活性制御ドメインと β サブユニットによる相互作用に加えて、 α サブユニット触媒ドメイン間の相互作用を有していた。ホモダイマーAKではエフェクター結合によるopen構造が安定化することが示されているが、 $\alpha_2\beta_2$ 型構造を有するCgAKでは、リジン、スレオニンの両エフェクターが結合するとclosed構造となることがわかった。

一方、AEC 耐性の CgAK 変異酵素は、両エフェクター存在下でも活性を示す。結晶構造により、両エフェクター結合時の closed 構造(不活性型構造)の安定性が AEC 耐性の CgAK 変異酵素では低下しており、同変異酵素が両エフェクター存在下でも活性を示すのは、同条件下でも容易に不活性型から活性型へと変換されるためと結論することが出来た。

以下、CgAK のエフェクター結合による制御メカニズムについて概説する。CgAK は $\alpha_2\beta_2$ 型構造をとるものの、 α サブユニットと β サブユニットの相互作用は、それほど強固なものではなく、各サブユニットは比較的容易に分離する。エフェクターであるスレオニンの制御ドメインへの結合は制御ドメイン(α サブユニットの制御ドメインと β サブユニット) 間の相互作用を安定化する。ついで、リジンの制御ドメインへの結合に伴う closed 構造への構造変化により、触媒ドメイン中においてアスパラギン酸結合部位近傍に位置しランダム構造をとっていた領域が、 β サブユニットの N 末端領域の β ストランドと β シートを形成するように構造変化する。それをきっかけとして、アスパラギン酸結合残基がアスパラギン酸結合に適さない配置をとり、代わりにリジンを結合するようになる。また、上述のように、新たに触媒ドメインに形成された β ストランドが、それと β シートを形成する β サブユニット N 末端の β ストランドを安定化する。それによって、 β サブユニットの N 末端に存在する Glu3 が、水分子を介してリジンのアスパラギン酸結合部位への結合を安定化する。

2) *Thermus thermophilus* 由来の HCS の活性制御機構

HCS のパラログでロイシン生合成に関わる 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素(IPMS)は、TIM バレル構造をとる活性ドメインと C 末に存在するロイシンによる制御ドメイン及びその両者をつなぐリンカードメイン I、II からなることがわかっている。しかしながら、HCS には TIM バレルドメインとリンカードメイン I しか存在しないことから、HCS は IPMS とは異なる機構により制御を受けることが推測された。HCS の制御機構及び、まだ不明な点も多い反応機構を明らかにすることを目的として、HCS の様々な複合体の構造を X 線結晶解析により決定した。基質結合型、および反応産物結合型 HCS の結晶構造を最高分解能 1.80 Å で決定した結果、これまで不明であった触媒機構の一端が明らかとなった。活性残基は二量体の他方のサブユニットから来る His292 であった。一方、リジンは、基質である 2-オキシグルタル酸と拮抗的に酵素を阻害することから、リジンが基質結合部位に結合すると予想したが、2-オキシグルタル酸とリジンでは化学構造が異なることなどから、結晶構造の決定が必要であった。そこで、リジンが結合した不活性型の結晶構造についても 1.80 Å 分解能で決定した。その結果、我々が予想した通り、リジンは基質結合部位に結合していることが明らかとなった。その際、2-オキシグルタル酸の末端のカルボキシル基を認識しているアミノ酸残基が水素結合ネットワークを変えて移動し、リジンの末端のアミノ基を認識するというダイナミックな構造変化が観察された。さらには、触媒残基である His292 が活性中心から遠くに離れた位置に移動するように His292 を含む領域が 2 次構造を大きく構造変化させること、そしてその代わりにその位置に Tyr297 が入り込み、安定な構造をとることが明らかとなった。構造変化には幾つかのアミノ酸残基の flip が見られるが、そのうちの 1 つ His72 の Leu への置換により、リジンによるフィードバック阻害が解除されることから、こうしたアミノ酸が活性調節のスイッチの 1 つとなっていると考えられた。