

ATP 再生系基質アセチルリン酸の高生産を指向した酢酸キナーゼへのピロリン酸利用能の賦与

京都大学大学院農学研究科 河井重幸

【略歴】

1998年3月 京都大学大学院 農学研究科 食品工学専攻 博士後期課程退学

1998年4月 京都大学食糧科学研究所 助手

2001年4月 京都大学 農学研究科 助手 (2007年4月 同 助教 現在に至る)

(この間、2002年1月 博士 (農学) の学位を取得、2008年3月より1年間
スイス連邦ジュネーブ大学に留学)

はじめに

高価な ATP を要求する酵素を用いた物質生産系において、ATP の代わりに安価なポリリン酸 (鎖長が最大数千にまで達する無機リン酸の重合体。特に、鎖長 2 分子の重合体をピロリン酸と称す) をエネルギー供給源とした生産プロセスの優位性は計り知れない。ATP とポリリン酸の原料価格差のみならず、ポリリン酸の利用時の方が目的産物の精製も遥かに容易で、その純度も高い。しかし、ポリリン酸利用する酵素の種類が限られているため、かかる理想的な生産プロセスは現在のところ一例 (ポリリン酸を原料としたポリリン酸/ATP-NAD キナーゼ (NADK) を用いた NADP⁺ 生産プロセス [1]; 特許 4088251 号) を除いて実用化には至っていない。なお NADK は NAD⁺ をリン酸化して NADP⁺ を合成する反応を触媒する。ポリリン酸を利用できる他の酵素として、ポリリン酸依存グルコキナーゼ、同 ADP キナーゼ (ポリリン酸キナーゼ)、同 AMP キナーゼ、およびピロリン酸特異的酢酸キナーゼ (後述) が知られている。

ポリリン酸を原料 (エネルギー供給源) とした物質生産系の構築のために、著者らは次の 2 つの戦略 ①および②を提案している。①タンパク質工学的手法で ATP 依存キナーゼにポリリン酸利用能を賦与し、当該キナーゼを用いてポリリン酸を原料とした物質生産系を構築する。②酢酸キナーゼへのピロリン酸利用能の賦与により、ピロリン酸を原料として ATP 再生系基質アセチルリン酸を高生産する。①に関しては、第 6 回酵素応用シンポジウム研究奨励賞を受賞している (課題名「ポリリン酸の酵素的リン酸化物質生産系への応用を可能にする立体構造解析」)。当該研究に基づいて様々な検討を加えた結果、ようやく最近、ATP 依存 NADK に強いポリリン酸利用能を賦与することに成功した [2]。本講演では、ポリリン酸を原料 (エネルギー供給源) とした物質生産系構築のための 2 つの戦略に関して紹介する。

①ATP 依存 NADK へのポリリン酸利用能の賦与

ポリリン酸はそのシンプルな構造ゆえに原始地球環境下で生成し得たと考えられるため、ATP 生成前の「太古のエネルギー (化石ポリマー)」ではないかとの説も提唱されている。事実、系統樹上では「古い」生物とみなせるアーキアやグラム陽性細菌は、「先祖型酵素」とみなせるポリリン酸/ATP 依存 NADK を有し (ポリリン酸と ATP の両方を利用する)、「より進化した」生物であるグラム陰性細菌 (就中 γ -プロテオバクテリア) や真核生物は ATP に特異的な ATP 依存 NADK を有する。最近、最も進化したバクテリアである γ -プロテオバクテリアの NADK の構造に着目した結果、保存配列 GGDG モチーフに隣接する N (Asn 残基) を Thr 残基に置換するだけで、ATP 依存 NADK にポリリン酸利用能を賦与することに成功した [2]。これは、確かに人為的に「ATP 依存キナーゼにポリリン酸利用能を賦与することができる」ことを初めて示した成果であり今後の進展が期待される。さらに本知見に基づき、ポリリン酸/ATP-NADK から ATP 依存 NADK への遺伝子レベルでの進化過程も考察した [2]。

②酢酸キナーゼへのピロリン酸利用能の賦与

アメーバ *Entamoeba histolytica* ピロリン酸特異的酢酸キナーゼ (ehiAK) は、ピロリン酸と酢酸からアセチルリン酸 (ATP 再生系の優良な基質) を合成する。ピロリン酸と酢酸を原料としたアセチルリン酸の大量生産が可能になれば、安価なピロリン酸をエネルギー供給源とした、ATP 再生系を介した多様な有用リン酸化化合物の生産系が確立される。しかし、ehiAK はピロリン酸利用能という長所を有するものの、そのアセチルリン酸合成活性は微弱である。一方、大腸菌 ATP 特異的酢酸キナーゼ (ecoAK) はピロリン酸利用能を持たないが、ATP と酢酸からアセチルリン酸を合成する活性は強い。ehiAK および古細菌 ATP 特異的 AK (mthAK) の立体構造は決定済みであり、リン酸供与体 (ATP とピロリン酸) 特異性にかかわらず AK の一次構造の相同性は高い。したがって、これらの構造情報から AK の ATP とピロリン酸への特異性を決定する構造要因を明らかにし、活性が強い ecoAK へのピロリン酸利用能の賦与が可能になると期待された。構造情報の精査により、図 1A に示す 5 残基と同 B で囲んだ 2 残基が当該構造要因と推察された。本発表では、これらの残基の置換の結果を紹介する。

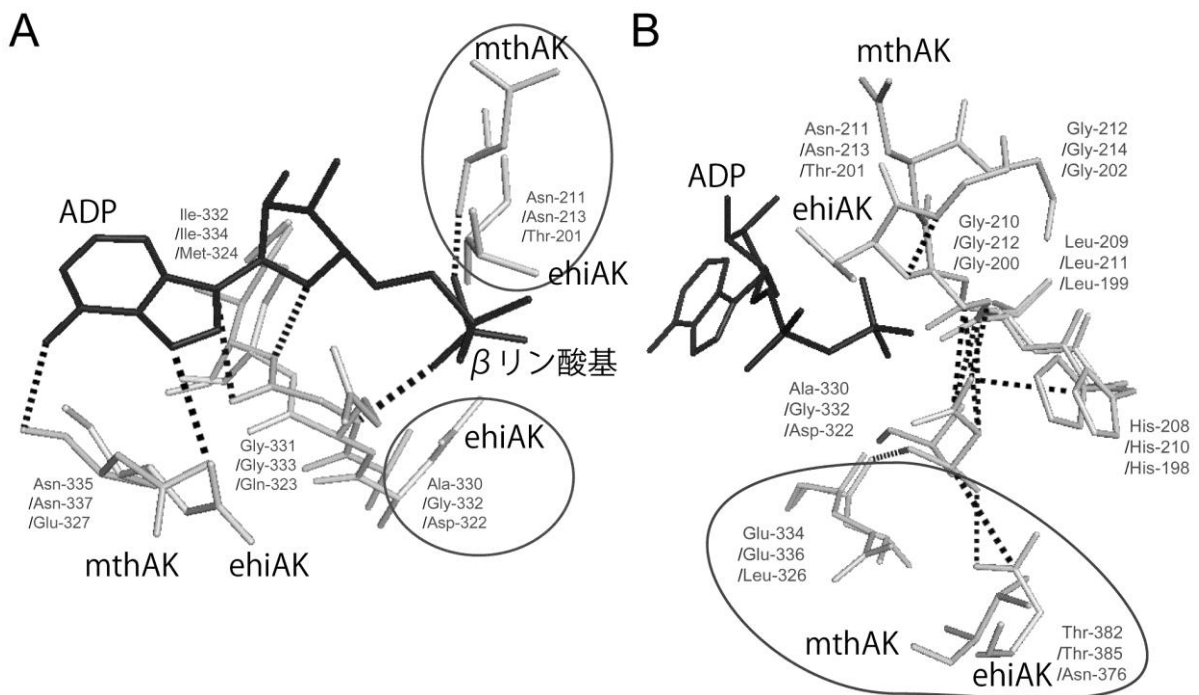


図 1 AK の基質結合部位の微細構造の重ね合わせ

A: ATP 特異的 mthAK -ADP 複合体とピロリン酸特異的 ehiAK の基質結合部位の重ね合わせ。アミノ酸残基は上から、ATP 特異的 mthAK、同 ecoAK、ピロリン酸特異的 ehiAK の順に表記。ehiAK の Thr-201、Asp-322 (囲み) を右の B で精査。B: ehiAK の Thr-201、Asp-322 と相互作用し得る残基 (囲み)。

謝辞

本研究は、京都大学農学研究科 食品生物科学専攻 生物機能変換学分野で行われたものである。京都大学名誉教授 (現 摂南大学 理工学部 教授) 村田幸作 先生に御礼申し上げます。

参考文献

- [1] S. Kawai, S. Mori, T. Mukai, H. Matsukawa, Y. Matuo & K. Murata: **J. Biosci. Bioeng.**, 92 (5):447-452 (2001).
- [2] Y. Nakamichi, A. Yoshioka, S. Kawai, K. Murata: **Sci. Rep.**, 3, 2632; DOI:10.1038/srep02632 (2013).