

Thermus thermophilus 由来の α -アミノアジピン酸アミノ基転移酵素(LysN)の基質認識機構の解析と基質特異性の改変

Analysis of the substrate recognition mechanism and alteration of the substrate specificity of an α -aminoadipate aminotransferase from *Thermus thermophilus*

Tomoharu Miyagawa, Takashi Miyazaki, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama

宮川智治、宮崎高志、富田武郎、葛山智久、西山真

(Biotechnology Research Center, The University of Tokyo)

(東京大学、生物生産工学研究センター)

E-mail: tomomiya@hotmail.co.jp

リジンは高等動物における必須アミノ酸の一つであるが、これを生合成することが可能な生物も多く存在する。一般に植物や真正細菌はジアミノピメリン酸(DAP)を経由する DAP 経路で、カビや酵母は α -アミノアジピン酸(AAA)を経由する AAA 経路でリジンを生合成する。しかし、*Thermus thermophilus* は真性細菌であるにも関わらず DAP 経路ではなく AAA を経由する経路を用いる。さらに AAA 以降はサッカロピンを経由するカビ・酵母の経路と異なった生合成経路によってリジンを生合成していることが明らかとなった。本経路は代謝の流れや酵素の配列相同性、機能において AAA までは TCA サイクルやロイシン生合成経路に、AAA 以降はアルギニン生合成経路に類似していると考えられ、生合成経路の進化に関する研究の格好の材料と考えられる。[1, 2, 3, 4]

LysN は Kynurenine/AAA アミノ基転移酵素ホモログとしてクローン化され、遺伝子破壊株の解析や組換えタンパク質の酵素学的解析から、本生合成経路の第 4 番目の反応を担うことが明らかとなった。一方で、分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(BcAT)やキヌレニンアミノトランスフェラーゼ(KAT)活性も持っていることが明らかとなった。結晶構造解析を行ったところ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AspAT)や Kat2 と同様に fold type I に属していることが明らかとなった。二量体中、一方の chain の活性中心に 2-oxoisocaproate(ロイシン生合成の中間体)が結合しており、いくつかのアミノ酸残基が疎水性のコアを形成して基質の疎水性領域を認識していることが明らかとなった。また、*Pyrococcus horikoshii* の持つヒト Kat2 ホモログ PH0207 では、基質が結合している状態の結晶構造が決定されている。その構造と LysN の構造を比較すると、活性中心にある Kat2 ホモログ間で保存されたアルギニン側鎖の向きが大きく異なっていた。これは、このアルギニンが両 Kat2 ホモログにおいて酸性アミノ酸に対する基質認識に寄与していることを示唆しており、このアルギニンをアラニンに置換した改変体を作製した。この改変体の活性と構造変化について報告する他、基質結合に関わる他のアミノ酸残基の改変体の活性についても報告する予定である。

References

- [1] Kobashi N. et al. (1999) J Bacteriol. 181, 1713-1718
- [2] Nishida H. et al. (1999) Genome Res. 9, 1175-1183
- [3] Miyazaki J. et al. (2001) J Bacteriol. 183, 5067-5073
- [4] Miyazaki J. et al. (2002) FEBS Lett. 512, 269-274