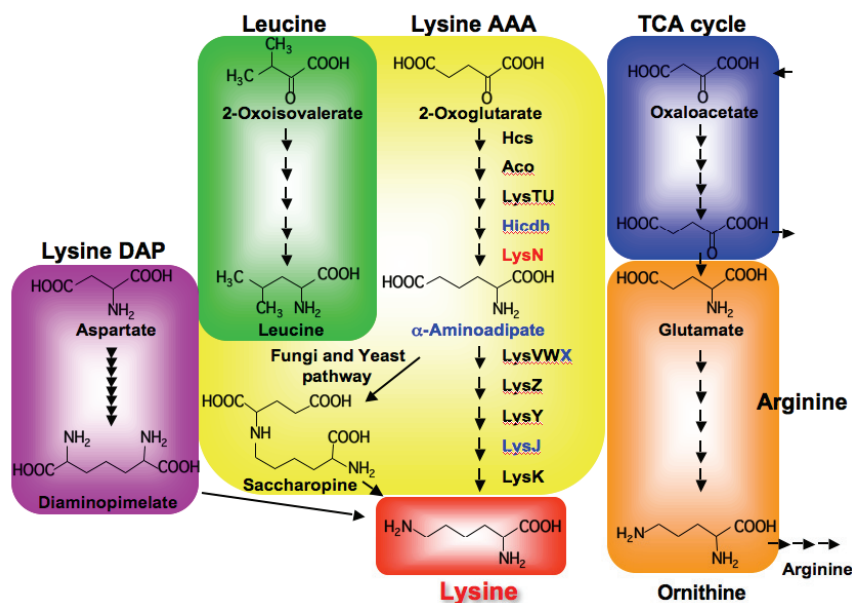


我々は、*T. thermophilus* が新しい生合成経路でリジンを生合成していることを示してきた。その生合成は、通常の生物に見られるアスパラギン酸のリン酸化から始まるジアミノピメリン酸(DAP)経路とは異なり、2-オキソグルタル酸を出発物質としている。生合成中間体である $\alpha$ アミノアジピン酸(AAA)まではロイシン生合成、TCA サイクルと類似した反応で、AAA からリジンまではアルギニン生合成のグルタミン酸からオルニチン生合成までの反応と類似した反応で生合成する<sup>1-4</sup>)。この生合成を構成する多くの酵素に共通に見られる特長は、その広い基質特異性である。我々が調べた範囲では、Hcs、Hicdh が少なくとも TCA サイクルの対応する反応を、LysJ、LysK がアルギニン生合成の対応する反応を触媒することがわかっている<sup>3-6</sup>)。



*T. thermophilus* のリジン生合成経路と他の経路の比較

このような基質特異性の冗長性が、酵素のどのような構造に基づいて発揮されるのかに興味を持たれたため、同リジン生合成の酵素の構造と機能解析を行ってきた<sup>6-8</sup>)。また、アミノ酸生合成は通常生合成の最終産物によって酵素レベルの阻害や転写の阻害を受けることが知られている。そこで、複数の系にまたがって反応を行うことのできる同酵素群の遺伝子の転写がどのように制御されているのかについても解析を行っている。本発表では、*lysN* にコードされる $\alpha$ アミノアジピン酸アミノ基転移酵素の構造と機能、および主要生合成酵素遺伝子クラスターの転写制御機能についての我々の研究成果を概説すると同時に、2-オキソグルタル酸とグルタミン酸の間の変換を触媒するグルタミン酸脱水素酵素において最近明らかになりつつある活性制御機構について紹介する。

## 1. 主要生合成酵素遺伝子クラスターの転写調節

リジン生合成酵素など 8 つの遺伝子を含む主要生合成酵素遺伝子クラスターは、*hcs* 遺伝子上流のプロモータに依存して転写されるが、その転写は翻訳とカップルしたかたちでリジンによって制御される<sup>9)</sup>。14 アミノ酸からなるアテニューエーターペプチドをコードする領域が *hcs* プロモータ直下流に存在しており、リジンが存在する条件下ではそのペプチドが翻訳され、結果として mRNA が  $\rho$  因子非依存性の転写終結構造をとる。リボソームによる翻訳と協調的に転写を行ってきた RNA ポリメラーゼはこの構造を認識して転写を終始する。一方、リジンが枯渇した場合にはアテニューエーターペプチドに 2 つ並んで存在するリジンコドンでリボソームが stall することにより、 $\rho$  因子非依存性の転写終結構造の形成が妨げられる。その結果、RNA ポリメラーゼが伸長反応を進め、下流にコードされる一連の遺伝子が転写されるようになる。

次いで、リジン生合成の後半の反応を触媒する酵素がアルギニン生合成の対応する反応を触媒しうることから、アルギニン生合成の転写調節因子である ArgR のリジン生合成への関与について解析を行ったところ、ArgR が *hcs* プロモータの-10 領域に結合し、リジン生合成を抑制することがわかった<sup>10)</sup>。リジン生合成とアルギニン生合成が抑制される場合には、2-オキソグルタル酸、グルタミン酸が蓄積する。また、プロリン分解もまたグルタミン酸を蓄積する反応系であり、リジン生合成とプロリンの分解との関係にも興味を持たれた。PutR は GntR ファミリーの転写因子であり、おそらくプロリン分解物である  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate あるいはそれと平衡関係にある glutamate-5-semialdehyde によって DNA 結合活性を失う、すなわちプロリン(分解物)が存在した場合には、転写抑制が解除される。ArgR の場合と同様なアッセイを行った結果、PutR も ArgR 結合領域にそれと競合的に結合することが明らかとなった。リジン生合成とアルギニン生合成が抑制される場合、そしてプロリン分解が促進される場合には、2-オキソグルタル酸、グルタミン酸が蓄積するようになる。グルタミン酸は 2-オキソグルタル酸とアミノ基を介して相互変換可能な物質であることから、リジン、アルギニン、プロリンなどのアミノ酸が抱負にある場合には 2-オキソグルタル酸を供給することで TCA サイクルをよく回す機構が働くと考えれば、これらの制御は理解できる。

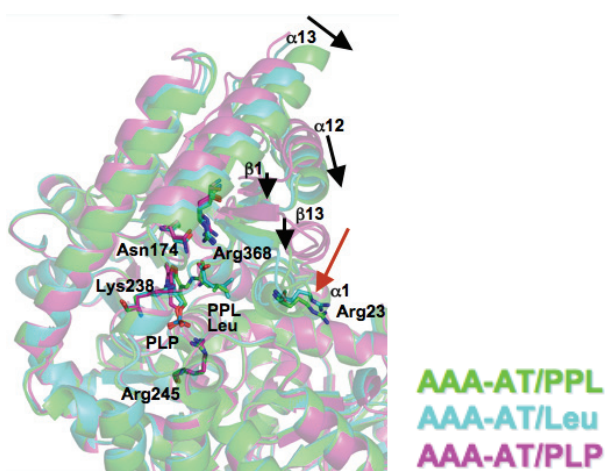
その他、我々は *T. thermophilus* に存在する数多くの転写因子の破壊株をもちいたトランスクリプトーム解析も行っており、それらの結果の一部も併せて紹介する。

## 2. グルタミン酸脱水素酵素の構造と機能

2-オキソグルタル酸とグルタミン酸の間の反応を触媒する酵素の一つがグルタミン酸脱水素酵素(GDH)である。この酵素はプロリン分解系の最終反応を触媒するとも言え、GDH ホモログをコードすると思われる遺伝子はプロリン分解系遺伝子クラスターに2つ並んで存在している。通常、ホモヘキサマーであることの多いため、どちらかの GDH ホモログが pseudogene であろうと当初は予想した。それぞれを大腸菌で発現精製してみると、より上流側にある *gdhA* にコードされるタンパク質 GdhA には GDH 活性が検出されなかったが、下流側にコードされる GdhB には GDH 活性が検出された。反応の方向性を調べたところ、GdhB はグルタミン酸合成反応を効率良く触媒するのに対し、*T. thermophilus* 菌体より直接部分精製した GDH は反対にグルタミン酸分解反応の活性が高く、組換え酵素と天然型酵素では異なる性質を示すことが明らかとなった。そこで、同一大腸菌内で様々な比率で GdhA、GdhB を生産させ、その活性を調べたところ、グルタミン酸分解反応についてはどれも変らないものの、生合成反応は GdhA の生産量の増大に伴い低下した。この結果は、菌の生理条件などにより、GdhA、GdhB が様々な比率で相互作用したヘテロヘキサマーとして存在し、その反応方向性の制御することで活性調節を行っている可能性を示している。

### 3. $\alpha$ アミノアジピン酸アミノ基転移酵素の構造と機能

*T. thermophilus* の  $\alpha$  アミノアジピン酸アミノ基転移酵素(AAA-AT)は、リジン合成の基質である2-オキソカプロン酸だけでなく、ロイシン合成、フェニルアラニン合成の対応化合物に対しても高い活性を有している<sup>11)</sup>。その基質認識の冗長性がどのように達成されるかを明らかにすることを目的として、補酵素であるピリドキサルリン酸 (PLP) 複合体構造、および PLP+ロイシン複合体構造、およびホスホピリドキシルロイシン(PPL)複合体構造を、X線結晶解析により決定した。AAA-AT はホモ二量体であり、その構造はアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)のものと類似していた。AspAT においても基質結合に伴い、small domain が動くことが報告されているが、AAA-AT ではそれが極めて大きく、特に N 末端の  $\alpha 1$  ヘリックスが基質側鎖の性質に応じて 9 Å 以上も移動することがわかった。こうした基質認識残基の可動性の高さが、AAA-AT が広い基質認識能を示す一つの要因となっているものと予想される。



基質結合における認識残基の動き

#### Reference

- [1] Kobashi, N., Nishiyama, M., and Tanokura, M. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1713-1718
- [2] Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T., and Yamane, H. (1999) *Genome Res.*, **9**, 1175-1183
- [3] Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5067-5073
- [4] Miyazaki, J., Kobashi, N., Fujii, T., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2002) *FEBS Lett.*, **512**, 269-274
- [5] Wulandari, A.-P., Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., Hoshino, T., and Yamane, H. (2002) *FEBS Lett.*, **522**, 35-40
- [6] Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1864-1871
- [7] Sakai, H., Vassilyeva, M.N., Matsuura, T., Sekine, S.-i., Gotoh, K., Nishiyama, M., Terada, T., Shirouzu, M., Kuramitsu, S., Vassilyev, D.G., and Yokoyama, S. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**, 729-740
- [8] Miyazaki, J., Fushinobu, S., Asada, K., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 6779-6788
- [9] Tsubouchi, T., Mineki, R., Taka, H., Kaga, N., Murayama, K., Nishiyama, C., Yamane, H., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 18511-18516
- [10] Fujiwara, K., Tsubouchi, T., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2006) *Microbiology*, **152**, 3585-3594
- [11] Miyazaki, T., Miyazaki, J., Yamane, H., and Nishiyama, M. (2004) *Microbiology*, **150**, 2327-2334