

好熱菌の新規リジン生合成系調節機構の解明とリジン発酵生産基盤の構築

西山 真

(東京大学生物生産工学研究センター 細胞機能工学研究室)

研究目的

我々は、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 では、リジンがジアミノピメリン酸を介さない経路(アミノアジピン酸経路)で合成されることを見いだした。アミノアジピン酸経路はカビや酵母などの下等真核生物においてのみ見られるリジン生合成経路として知られており、*T. thermophilus* のリジン生合成経路はアミノアジピン酸の合成まではカビ・酵母と同様に進行する。しかしながら、*T. thermophilus* の経路の後半はサッカロピンを経由するカビや酵母のものとは異なっており、全体としては新規の生合成経路ということができる。2-オキソグルタル酸からアミノアジピン酸までの反応は、ロイシン生合成の2-オキソイソ吉草酸からロイシンまでの反応や、クエン酸サイクルのオキサロ酢酸から2-オキソグルタル酸までの反応と類似している一方、

アミノアジピン酸からリジンまでの変換は、アルギニン生合成のグルタミン酸からオルニチンまでの反応や、プロリン生合成やアスパラギン酸グループアミノ酸生合成の一部と類似した反応により進行することなど、同リジン生合成酵素群がアルギニンをはじめとする他のアミノ酸生合成酵素群などと進化的関連があることが明らかとなっている。このことは同生合成系が生命システムの初期進化及び構築において重要な位置を占めることを示している。本研究では、同リジン生合成酵素群の基質認識、反応機構、フィードバック阻害機構を解明し、基質特異性獲得を通じた、生命システムの構築および進化の道筋を明らかにするとともに、*T. thermophilus* の新しいリジン生合成経路を利用し、リジンの新規製造プロセスの基盤を構築することを目的とする。

研究方法

リジン生合成系を構成する全ての酵素をコードする遺伝子をクローン化し、その全てについて大腸菌を用いて大量に生産する系を構築した。各酵素を精製した後、反応的・進化的に関連する生合成システムにおける基質、すなわちアルギニンや、ロイシン生合成における中間体を基質とした反応を行い解析した。関連酵素の一次配列および三次元立体構造を参考にして、各酵素の基質特異性を決定しているアミノ酸残基を推定し、そのアミノ酸残基の改変を通じて、基質認識機構を解析した。

研究結果

これまでに行ってきた生合成経路の解析により、リジンは2-オキソグルタル酸から10段階の反応を経て合成されると予想される。まだクローニングができていなかった2つ、ホモイソクエン酸からケトアジピン酸を生成するホモイソクエン酸脱水素酵素、そしてその次の過程であるアミノアジピン酸への変換を触媒する酵素をコードする遺伝子のクローン化を行った。前者に関しては、ホモイソクエン酸脱水素酵素がイソクエン酸脱水素酵素やイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素とアミノ酸配列の相同性があることが予想されるため、両遺伝子の内部配列を基に degenerate primer を作製し、クローン化することとした。後者に関しては、哺乳動物のアミノアジピン酸アミノ基転移酵素の配列を参考にして、同様にPCRを用いてクローン化することとした。クローン化した遺伝子の破壊株を作製し、栄養要求性を調べたところ、ホモイソクエン酸脱水素酵素遺伝子の破壊株においては、明瞭なリジン要求性が、アミノアジピン酸アミノ基転移酵素遺伝子の破壊株においては、部分的なリジン要求性が見いだされた。ホモイソクエン酸脱水素酵素遺伝子について大腸菌での大量発現系を構築し、精製酵素を用いて、基質特異性を明らかにした。また、反応メカニズムに加えて、基質認識機構も類似していると考えられるイソクエン酸脱水素酵素やイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の三次元立体構造を参考にして、基質特異性を決定するアミノ酸残基を同定することに成功した。

アミノアジピン酸アミノ基転移酵素に関しては、同酵素が分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素様の活性を有するという予備的なデータを得ている。また、アミノ酸生合成では系の初発酵素がフィードバック阻害によって活性制御を受けることがよく知られているが、本リジン生合成系の初発酵素であるホモクエン酸合成酵素について解析したところ、同酵素がリジンによって強い阻害を受けることが明らかになった。ホモクエン酸合成酵素は、その一次配列においては2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素を類似しているが、2-オキソ吉草酸を基質として認識しなかった。その一方で、2-オキソグルタル酸の代わりにオキザロ酢酸を用いても反応を触媒できることが明らかとなった。このことは、ホモクエン酸合成酵素が、一次配列の相同性は全くないもののクエン酸合成酵素としても機能しうることを示している。

まとめ

本研究等を通じて、*T. thermophilus* HB27 のリジン生合成酵素群をコードする全ての遺伝子を取得することに成功し、それら全てについて効率のよい生産系を確立することに成功した。また、それらのいくつかについては基質の認識機構についての知見を得ることができ、リジン生産への基盤が構築できたものと考えられる。今後は、これらの知見を踏まえ実際のリジン生産へとつなげていきたい。