

# アミノ酸発酵菌 *Corynebacterium glutamicum* アスパラギン酸キナーゼの活性調節機構の解明

富田 武郎

(東京大学 生物生産工学研究センター)

## 研究の目的

リジンはヒトを始めとした哺乳類が、食物から摂取しなければならない必須アミノ酸である。そのため、リジンは哺乳類の生育に必須な因子であり、家畜の飼料添加物として大量に用いられている。グルタミン酸発酵で知られる *Corynebacterium glutamicum* はリジンの工業的発酵生産に用いられている。本菌は、バクテリアが一般に有している Diaminopimelate (DAP) を中間体とする DAP 経路によりリジンを生産している。この経路は、アスパラギン酸キナーゼ (Aspartate kinase, AK) によるアスパラギン酸の  $\gamma$ -カルボキシル基のリン酸化により開始される 10 段階からなり、AK が経路の最終産物であるリジン、スレオニンによりフィードバック阻害を受けることによりリジン生産量が調節されている。リジン大量生産を目指し、AK の調節を解除するような変異株の探索が行われ、リジンアナログである (S)-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC) 耐性菌がリジン大量生産菌としてスクリーニングにより得られ、リジンの大量生産に用いられている。しかしながら、リジン、スレオニンによるフィードバック阻害機構は未知のままであり、大量生産への戦略はスクリーニングによる変異体取得が一般的であるのが現状である。しかし、この機構を解明し、人為的に AK の調節解除、高活性化変異体を作製することが出来れば、直接的にリジン大量生産系の開発へつなぐと考えられる。そこで、私は AK の結晶構造を明らかにし、活性調節機構を構造生物学的な手法により解明することを試みた。

## 方法

*C. glutamicum* 由来の AK (CgAK) の全長タンパク質 (CgAK) および  $\beta$ -サブユニット (CgAK  $\beta$ ) の組換えタンパク質をそれぞれ大腸菌 BL21(DE3) RIL-CodonPlus 株に発現させ、2 段階のカラムワークにより精製した。CgAK および CgAK  $\beta$  の精製タンパク質をリジン・スレオニン添加などの条件下において、結晶化スクリーニングを行い、それぞれの結晶を得ることに成功した。CgAK  $\beta$  の構造決定は既に我々の研究室で決定していた *Thermus thermophilus* 由来 AK の  $\beta$ -サブユニットの構造をモデルとして用いて分子置換法により行った。CgAK の構造決定は *Methanococcus jannaschii* AK のホモオリゴマー型 AK に特徴的な 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスを除いた構造と CgAK  $\beta$  の構造をモデルとして用い分子置換法により行った。

## 結果

### CgAK $\beta$ の構造

CgAK $\beta$  の結晶構造を 1.58Å 分解能で決定した<sup>(1)</sup>。2 つの ACT ドメインの間にスレオ

ニンがタンパク質内部に埋まる形で結合しており、CgAK $\beta$ に2つのスレオニンが結合していることが明らかとなったが(Fig. 1)、リジンは結晶化条件に添加したにも関わらず観察できなかった。スレオニンの結合の様式からスレオニンによるCgAK $\beta$ の2量体形成が予想されたため、ゲル濾過による分子量変化の解析を行った結果、野生型タンパク質やリジン耐性を示す変異体がスレオニンによる2量体形成を起こすのに対し、スレオニン耐性を示す変異体がそのような変化を起こさないことから、スレオニンによる $\beta$ -サブユニットの強固な2量体形成が阻害機構の1段階目となっていることが明らかとなった。

### CgAKの構造

CgAKの結晶構造を2.50Å分解能で決定した。CgAKは予想された通り $\alpha_2\beta_2$ 型のヘテロテトラマー構造を有していた(Fig. 2)。 $\beta$ -サブユニットは $\alpha$ -サブユニットC端領域にある $\beta$ -サブユニットと相同配列を有する活性制御ドメインと相互作用し、CgAK $\beta$ と同様に活性調節ユニットを2つ形成していた。2つの活性調節ユニット当たり、スレオニン2つとリジン1つが結合する(全体としてはスレオニン4つとリジン2つ)。スレオニン結合様式はCgAK $\beta$ で観察されたものと同様であったが、全体構造でリジンの結合が初めて観察できた。リジンは活性中心から離れた2つのACTドメインの間にスレオニンと同様埋まるように結合していたが、活性中心近傍に存在する同等のサイトには見られなかった。実際に、両サイトのリジン結合、活性調節への寄与の差異を証明するためにリジンの $\epsilon$ -アミノ基とイオン結合を形成しているアスパラギン酸残基をアラニンへ置換した変異体を作製し、リジンによる影響を調べた結果、片方のリジンサイトのみ活性調節に寄与していることが示唆された。

### フィードバック阻害機構

最近、大腸菌AKにおいてアスパラギン酸・ADP・Mg<sup>2+</sup>結合活性型構造が報告された。それと比べ、CgAKのリジン・スレオニン複合体構造では、活性中心周辺のアミノ酸残基の配置が基質結合に適さない不活性型の構造をとっていることが明らかになり、

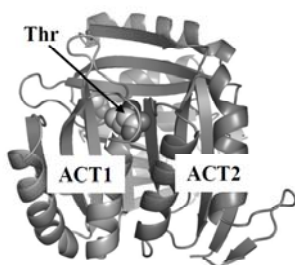


Fig. 1. Structure of CgAK $\beta$ .

CgAK $\beta$ はこれまでに知られている $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -foldからなるACTドメインの2回繰り返しペプチドの二量体を形成していたが異なるACTドメイン(ACT1, ACT2)が隣接する新規な二量体化様式であった。Thrは二量体間の間に埋まる形で結合していた。

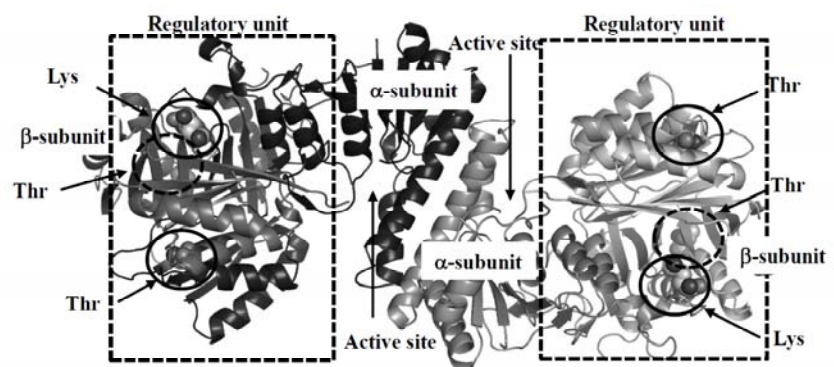


Fig. 2. Structure of CgAK.

CgAKは $\alpha$ -サブユニット間で中央の1つのinterfaceを形成しており、両脇に存在する $\beta$ -サブユニットはそれぞれ異なる $\alpha$ -サブユニットとinterfaceを形成していた。

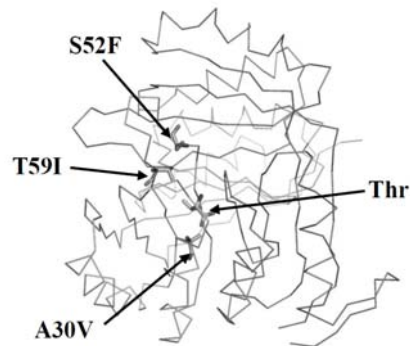


Fig. 3. Mapping of AEC resistant mutation.

同酵素がアロステリックな構造変化を受けることが示唆された。また、活性中心近傍にリジン様の電子密度が観察されたことから、このような構造変化に伴う競合阻害機構が働いている可能性も示唆された。また、CgAK $\beta$ との構造比較等から、このような不活性型への変化は、スレオニンにより $\alpha$ -サブユニットの活性制御ドメインと $\beta$ -サブユニットの相互作用が誘導された後、リジン結合が起こり、そのシグナルが活性調節ドメインと触媒ドメインの間の相互作用を仲介して、活性中心に伝達されることにより引き起こされることが示唆された。

#### AEC 耐性機構

AEC がリジンアナログであることからリジン結合サイト周辺に位置すると予想されていた。AEC 耐性をもたらすアミノ酸置換を CgAK $\beta$ の結晶構造上でマッピングしたところ、スレオニン結合サイト周辺に集中している(A30V, S52F, T59I)ことが明らかになった(Fig. 3)。変異体の $\beta$ -サブユニットの分子量変化やリジン・スレオニン感受性プロファイルから、A30V, T59I はスレオニン耐性変異、S52F はリジン耐性変異であることが明らかとなった。実際、スレオニン結合サイトにおいて前者2つのアミノ酸残基はスレオニン結合に直接関与しているのに対して、S52 残基は結合サイト近傍であるがサイトから離れた方向にその側鎖を伸ばしていた。このことは、S52 残基がスレオニン結合シグナルを活性中心へ伝達するのに重要な役割を担っている可能性を示している。

#### 結論

*C. glutamicum* 由来の AK の $\beta$ -サブユニットおよび全長の結晶構造を決定し、さらに部位特異的変異導入酵素を用いたリジン・スレオニン感受性プロファイルの解析、分子量変化の解析を行うことで、本酵素の協奏阻害機構を詳細に解析することができた。本研究はフィードバック阻害解除変異体の人為的な作製において基礎的な知見をもたらしたと考えられる。

#### 文献

1. Yoshida, A., Tomita, T., Kurihara, T., Fushinobu, S., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2007) Structural insight into concerted inhibition of  $\alpha_2\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Biol.* **368**, 521-536.