

# アミノ酸・ヌクレオチド細胞内恒常性の C1 代謝回転を介した共役機構

田中 寛

(千葉大学大学院 園芸学研究科/現所属：東京工業大学 資源化学研究所)

## 研究の目的

アミノ酸とヌクレオチドは生体を構成する重要な成分であり、これらの細胞内レベルは様々な段階で厳密な制御を受けている。従って、これら代謝産物をバクテリアにより発酵生産する場合には、それぞれの代謝産物における恒常性維持機構の理解が重要である。一般に、アミノ酸が通常のレベルより低下すると、アミノ酸に結合していない tRNA が増加し、これがリボゾームに結合することにより ppGpp を介した緊縮応答が発動する。ppGpp は新規リボゾーム合成やペプチド伸長反応を抑制してアミノ酸の消費を抑制すると同時に、アミノ酸合成遺伝子の転写を活性化してアミノ酸合成を促進し、アミノ酸の恒常性維持に中心的な役割を果たしている。さらに、ppGpp は DNA 合成の開始や伸長を阻害することでヌクレオチド消費反応の抑制に関わると考えられているが、ヌクレオチド合成代謝への影響は未評価のままである。

最近我々は、海産 *Vibrio* 由来のルシフェラーゼ活性を指標とすることで、大腸菌細胞内の還元力レベルをリアルタイムで測定する系を構築した (1)。そしてこの系を用いた解析で、緊縮応答の誘導 (培地中へのセリン、イソロイシン添加など) が、細胞内の還元力レベルを大きく低下させることを見いだした。この現象は ppGpp の産生能を持たない ppGpp<sup>0</sup> 株では見られないことから、ppGpp の関与が示唆される。また、緊縮応答の誘導時に、葉酸を介した C1 転移反応の生成物 (グリシン、メチオニン、チミジン、アデノシン、パントテン酸、(2)) を培地中に加えると、この還元力の低下が解消した。これは ppGpp により葉酸代謝が阻害され、その結果としてヌクレオチド合成の阻害と還元力の低下が引き起こされることを意味している。この新規調節機構はアミノ酸代謝と核酸代謝を協調させる制御点である可能性がある。本研究では、ppGpp による一連の代謝への影響を明らかにすべく解析を行った。

## 実験方法

本研究では、大腸菌 MC4100 の *relA*<sup>+</sup> 誘導株 (CK8) を標準株として用いた。ルシフェラーゼを発現するプラスミド pLXUV5 では、恒常的に発現する *lacUV5* プロモーターの下流に *luxCDABE* オペロンが連結されており (Fig.1)、形質転換した大腸菌はそのまま自律的に発光する。細胞内の還元力は 100  $\mu$ l 培養液の 10 秒間の発光量としてルミノメーター (Berthold Lumat LB9507) を用いて測定した。最小培地として MOPS 培地を用い、炭素源としては 0.4% のグルコースまたはガラク

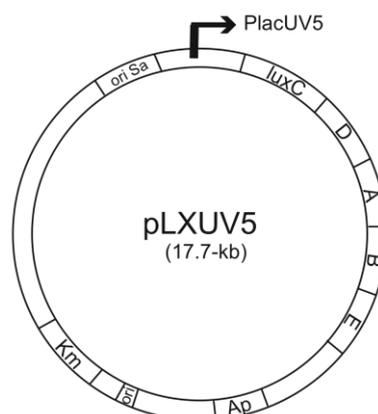


Fig.1 Structure of pLXUV5 (PlacUV5::luxCDABE)

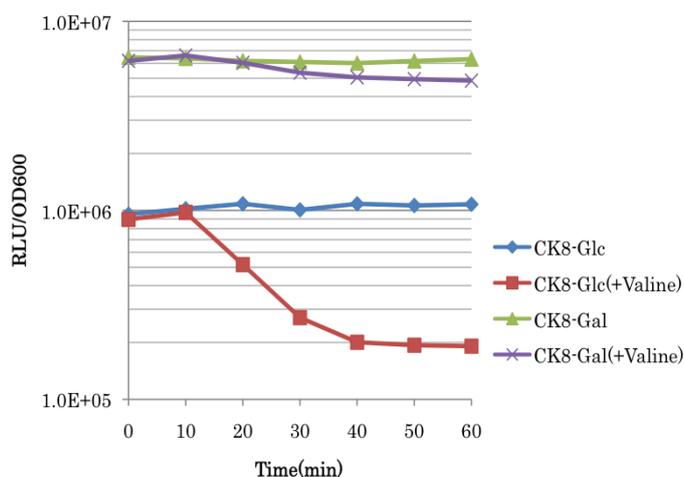
トースを添加した。培地中へのアミノ酸添加は 50  $\mu\text{g/ml}$  の終濃度とした。カナマイシン耐性カセットを挿入した *crr* 変異は KO コレクション (3) から得て、P1 形質導入法により CK8 株に移して供試株を得た。細胞内の代謝産物量の測定は、慶応大学先端生命科学研究所との共同研究として行った。

## 結果

1、グルコースを炭素源とした最小液体培地において、対数増殖期の CK8 (pLXUV5) 培養液にイソロイシンを添加すると、バリン不足を引き起こすことで弱い緊縮応答が誘導される。この際の細胞内代謝産物量の変化を調べたところ、グルコース 6 リン酸、グルセロアルデヒド 3 リン酸など、解糖系の中間産物量の低下が観察された。また同様に、解糖系への阻害効果は、培地からの急激なアミノ酸除去による緊縮応答時にも観測されており (慶応大学斎藤菜摘博士、私信)、ppGpp が解糖系の Flux を阻害することで細胞内の還元力生成を妨げ、還元力プールの低下を誘導する可能性が示唆された。

2、最小液体培地における培養で、グルコースの以外の糖を炭素源として培養し、緊縮応答の効果を生シフェラーゼ活性の測定により調べた。Fig.2 には、ガラクトースを炭素源に用い、培地へのバリン添加により強い緊縮応答を誘導した際の結果を示している。グルコース培養時と大きく異なり、ガラクトース培養ではバリン添加の生シフェラーゼ活性への影響は殆ど観察されなかった。マルトース、グリセロールなど、他の炭素源を用いた際にもバリン添加の影響は見られず、むしろグルコース培養時の現象の方が特殊なケースであることが判明した。

3、グルコースを炭素源とした際の特異的現象であれば、グルコースの細胞内取り込みに関わる PTS (Phospho-Transferase System) の関与が考えられる。そこで、グルコース取り込みの際のリン酸転移に関わる  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  タンパク質に注目した。 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  はリン酸化時にはアデニル酸環化酵素を活性化、非リン酸化時にはラクトース透過酵素を阻害するな



**Fig. 2.** Effect of carbon source on the valine-induced redox decline. Valine (50 mg/ml) was added to the medium at time 0, and luciferase activity was monitored.

ど、多くの酵素活性の調節に関わることが知られている。 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  をコードする *crr* 遺伝子の破壊株を作成し、2と同様のバリン添加実験を行った。その結果、グルコース培養でもガラクトース培養でも、どちらも同様に、ルシフェラーゼ活性の低下が中程度に観察されるという結果が得られた。グルコース培養時には  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  の多くは非リン酸化状態で、ガラクトース培養時にはリン酸化型に蓄積していると考えられるので、これら  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  が ppGpp と直接か間接に相互作用して PTS 活性の調節に関わると考えれば、上記の *crr* 破壊株における結果を説明することができる。

## 結論

以上の結果、および他の最近の知見を説明するために、現在までに Fig.3 のような作業モデルを構築した。アミノ酸の飢餓応答は ppGpp のシグナルを介して糖異化代謝（解糖系）の Flux を阻害し、これにより細胞内の還元力プールの低下を引き起こす。この際にはグルコースの細胞内輸送に関わる PTS 系の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  タンパク質が重要な役割を果たす。また C1 代謝との関連では、ppGpp の作用点の一つに葉酸代謝の阻害があり、PTS の阻害に重要な役割を果たしていると考えられる。直接の標的の同定については、今後の重要な課題である。トリメトプリムで DHFR を阻害し、強制的に葉酸飢餓を誘導した際にもルシフェラーゼ活性は急激に低下する。これは葉酸飢餓によりグリシン、メチオニン飢餓での緊縮応答が起こり、ppGpp を介したレスポンスが誘導されると考えられる (4)。本研究により、アミノ酸代謝、C1 代謝、糖代謝の間の密接な関係が明確になってきたということができる。

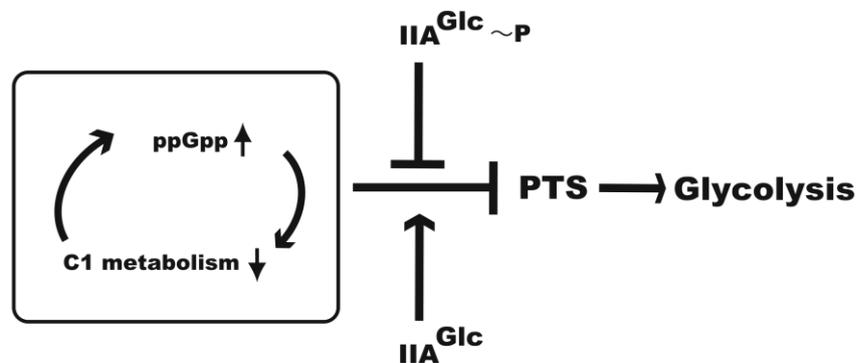


Fig.3 Model for Redox Pool Control

## 謝辞

細胞内メタボロミクス解析にご協力いただき、未発表データの議論をいただいた慶応大学先端生命科学研究所、斎藤菜摘博士、また、大腸菌変異株を分与いただいた NBRP 大腸菌事業 (NIG) に感謝申し上げます。

## 文献

1. Koga, K., Harada, T., Shimizu, H. and Tanaka, K. (2005) Bacterial luciferase activity and the intracellular redox pool in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* **274**, 180-188.
2. Harvery, R. J. (1973) Growth and initiation of protein synthesis in *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim. *J. Bacteriol.* **114**, 309-322.
3. Yamamoto, N., et al. (2009) Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Sys. Biol.* **5**, 335.
4. Kwon, Y. K., Higgins, M. B. and Rabinowitz, J. D. (2010) Antifolate-induced depletion of intracellular glycine and purines inhibits thymineless death in *E. coli*. *ACS Chem. Biol.* **5**, 787-795.