

高度好塩性アーキア由来 sugar kinase の機能解析

佐藤 喬章

(京都大学大学院 工学研究科)

研究の目的

生物は系統学的分類により真核生物・細菌・アーキアの3種に大別される。アーキアはこれまでによく研究されている真核生物や細菌とは異なる代謝経路を多く有している。申請者はこれまでにアーキアにおける新規 AMP 代謝経路を発見し、その経路において新規酵素 AMP phosphorylase と ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15Pi)に加え生体内機能が不明であった RuBisCO がセットで機能していることを明らかにした (Fig.1) ¹⁾。

興味深いことにゲノム解析が完了している17種の高度好塩性アーキアのうち4種は、R15Pi の homolog (R15Pih) のみを単独で保有している。一方、sugar kinase と uridine phosphorylase というその予測機能が AMP 代謝経路の反応と類似している遺伝子と R15Pih 遺伝子とがオペロンを形成しており、これらがセットでかつ新規な代謝経路で機能している可能性も考えられる (Fig. 1)。この未知代謝経路同定に向け、本研究では活性測定が行いやすい sugar kinase の機能解明を目指す。

方法

RbsK タンパク質の調製

各遺伝子の使用コドンが大腸菌型に改変し、大腸菌における大量発現を行った。その後、各タンパク質を発現させた大腸菌を超音波破碎し、遠心後上清について陰イオン交換カラム Resource Q およびゲル濾過カラム Superdex200 による精製を行った。

キナーゼ活性測定

キナーゼ活性測定は分光学的手法である pyruvate kinase (PK)/lactate dehydro- genase (LDH)法により行った。本法ではキナーゼ、PK および LDH 反応を共役させることにより、ATP(NTP)からキナーゼ反応により産生した ADP (NDP)を検出する。LDH が反応の際に消費する NADH は 340 nm に吸光を持つことからこの吸光度の減少から NADH の消費量=ADP の産生量を算出できる。本法では NDP を検出することから、様々な糖を

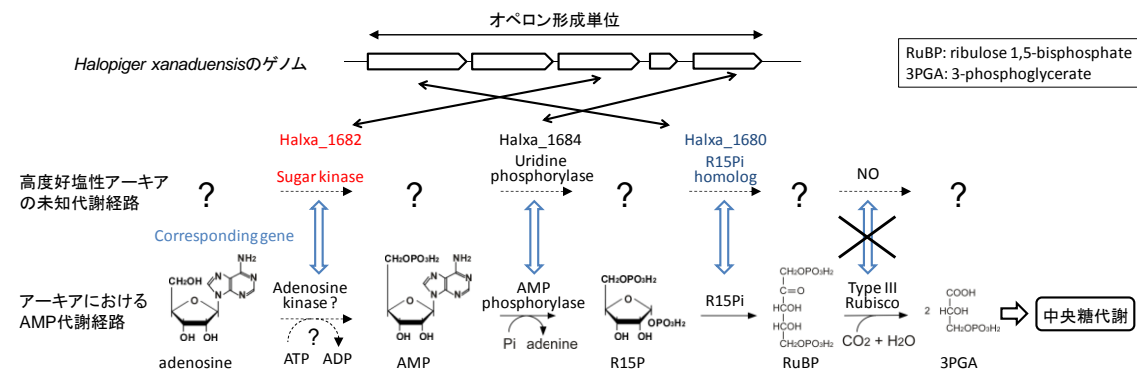


Fig. 1. アーキアの AMP 代謝経路と高度好塩菌において予想される未知代謝経路

リン酸基受容体として調べることができる。

結果

RbsK タンパク質の調製

R15Pih と sugar kinase をセットで保有する高度好塩性アーキアである *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloterrigena turkmenica*, および *Halopiger xanaduensis* における RbsK (各々を *Hs-RbsK*, *HL-RbsK*, *Ht-RbsK*, *Hx-RbsK* とする) の調製を行った。*HL-RbsK* および *Ht-RbsK* は大腸菌で安定に発現させることができなかった。また *Hs-RbsK* については大腸菌内での発現には成功したが、破碎後不溶性画分に含まれ、封入体を形成することが分かった。一方、*Halopiger xanaduensis* 由来の RbsK は可溶性であり、本酵素の精製を行った (Fig. 2)。

キナーゼ活性測定

Hx-RbsK がどのような糖基質に対して活性を示すかを検討した。単糖、二糖、リン酸化糖、アミノ糖、ヌクレオシドなど様々な糖について網羅的に検討を行った。またリン酸基供与体に何を利用するか不明であったため ATP, CTP, UTP, GTP の混合物をリン酸基供与体として用いた。活性測定の結果、ribulose 5-phosphate (Ru5P) を基質としたときのみ、低いながらも有意なキナーゼ活性が観察された (Fig. 3A)。また、本酵素はリン酸基供与体として ATP ではなく CTP を用いる可能性が示唆された (Fig. 3B)。

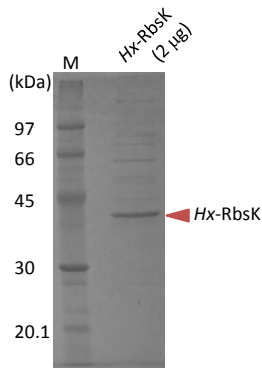


Fig. 2. 精製 Hx-RbsK

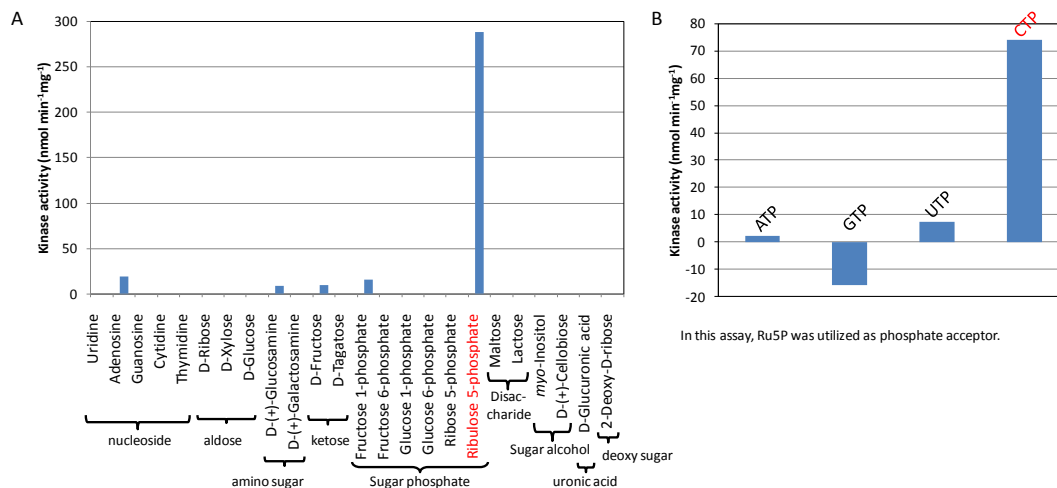


Fig. 3. 様々な糖に対する *Hx-RbsK* のキナーゼ活性(A) リン酸基供与体の検討(B)

結論

本研究によって好塩性アーキアにおける機能不明の sugar kinase、RbsK が Ru5P に対してキナーゼ活性を示す可能性が示唆された。Ru5P がリン酸化されると Rubisco の基質である ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) が生成する可能性があるが、今回調べている好塩菌は Rubisco を持っていないことから本酵素の活性は非常に興味深い。今後 RbsK が本当に RuBP を生成しているのか？生成しているなら RuBP はどのように代謝されているのか？を検討していく予定である。

文献

- 1) Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007) Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science* **315**: 1003-1006