

# *Corynebacterium glutamicum* の中心炭素代謝を担う PDH-ODH 活性 バランス制御機構に関する研究

古園 さおり

東京大学大学院 農学生命科学研究科

## 研究の目的

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) と 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (ODH) は中心炭素代謝の鍵酵素である。一般に PDH と ODH は 3 種 (E1, E2, E3) のサブユニットで構成され、別個の複合体として存在する。ところが、アミノ酸発酵生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* では、2つの E1 サブユニット (CgE1p と CgE1o) が CgE2 および CgE3 サブユニットを共有して PDH-ODH ハイブリッド酵素複合体を形成するという極めてユニークな特徴を有している。PDH および ODH 活性をそれぞれ規定する CgE1p と CgE1o の会合比の変化が解糖系とクエン酸回路の代謝フローのバランスを制御する可能性が想像されるが、その詳細な機構は全く明らかにされていなかった。本研究では *C. glutamicum* 由来 PDH-ODH ハイブリッド酵素複合体を対象に、中心炭素代謝の要となる 2 つの酵素活性のバランス制御に関する新規調節機構の解明を目指した。

## 方法

CgE1p, CgE1o, CgE2, CgE3 サブユニットの大腸菌組換えタンパク質を用いて PDH および ODH の *in vitro* 再構成系を確立した。複合体形成、サブユニットの会合状態はゲルろ過クロマトグラフィーおよびプルダウンアッセイにより調べた。In vivo での複合体の検出は *C. glutamicum* ライゼートを用いた超遠心分画およびウェスタンブロット解析により行った。CgE2-K391 変異株の作成は、2 点交差組換え法により CgE2 欠損株をまず取得し、K391 変異を含む CgE2 遺伝子をノックインすることにより行なった。PDH および ODH の酵素反応パラメータの算出には K391 変異株および野生株より調製したライゼートを用いた。

## 結果

### 1. *In vitro* 再構成を用いた PDH-ODH 複合体のサブユニット構造と機能解析<sup>1)</sup>

大腸菌組換えタンパク質を用いた *in vitro* 再構成系を用いて、PDH-ODH 複合体のサブユニット組成および PDH, ODH 活性との相関について検討した。CgE3 への N 末タグ付加により CgE2-CgE3 を共精製し、これに CgE1p または CgE1o を混合すると PDH または ODH 活性が再現することを確認した。共精製した CgE2-CgE3 の分子量をゲルろ過クロマトグラフィー分析で算出したところ 780 kDa となり、6 分子の CgE2 と 8 分子の CgE3 を含むと推定された。仮説モデルとして、6 量体 (3 量体×2)

の CgE2 が複合体コアを形成し、そこに 2 量体の CgE3 が 4 ヶ所で会合すると考えられた (図 1)。CgE2-CgE3 部分複合体に CgE1o を添加すると、ODH 活性を示す新たなピーク画分が観察された。再構成された ODH 複合体の分子量はおよそ 1 MDa と見積もられ、大腸菌由来 PDH (4.8 MDa) や ODH (2.4 MDa) と比較してコンパクトな複合体であることが明らかとなった。この結果は、*C. glutamicum* ライゼートを用いた超遠心分析より示唆された複合体の分子サイズ比較の結果と一致していた。一方、CgE2-CgE3 部分複合体に CgE1p を添加すると PDH 活性が検出されたが、ゲルろ過クロマトグラフィーで CgE2-CgE3 と CgE1p を含む PDH 複合体に相当するピーク画分は検出されず、CgE2 に対する CgE1p の結合は弱いとゲルろ過クロマトグラフィーでは検出できなかったと結論した。

次に、2 つの E1 サブユニットの会合比の変化が PDH および ODH 活性に与える影響を検討した。再構成した PDH に CgE1o を添加すると、CgE1o 量依存的に PDH 活性の阻害が観察された。再構成 ODH に対する CgE1p 添加でも同様の阻害が観察されたが、前者と比べて阻害効果は弱く、CgE2 に対する CgE1p の結合は CgE1o よりも弱いことがこの結果からも支持された。以上の結果から、CgE1p と CgE1o は CgE2-CgE3 部分複合体に対し異なる親和性を持って会合しており、CgE1p と CgE1o の会合比が PDH/ODH 活性のバランスに影響を及ぼすことが示唆された。

一般に E1 サブユニットは 2 量体として存在し、CgE1o もまた 2 量体として CgE2 コアに会合すると考えている (図 1)。しかしながら、CgE1o は溶液中で安定した 6 量体として存在していた。また CgE2-CgE3 に対し結合が飽和すると考えられる過剰量の CgE1o を添加しても ODH 活性は飽和せず増加し続けた。*C. glutamicum* ODH はサブユニット会合様式の変化による未知の活性化機構を有する可能性が考えられる。一方、CgE1p は溶液中で 2 量体として存在したが、*in vivo* では CgE2 を含まない高分子画分にも存在しており、未知のタンパク質と相互作用している可能性が考えられた。

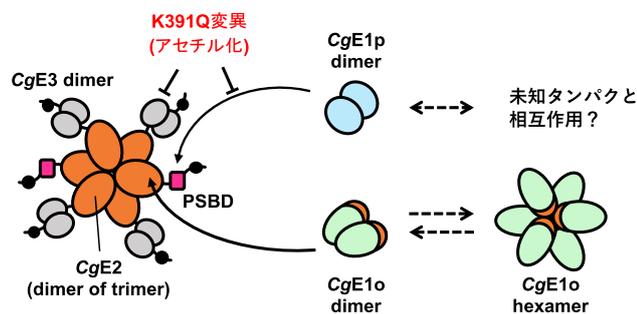


図1 *C. glutamicum* 由来PDH-ODH ハイブリッド複合体の推定構造

## 2. CgE2 サブユニットにおける PSBD アセチル化部位の機能解析<sup>2)</sup>

大腸菌 PDH や ODH では E1 と E3 サブユニットの各 2 量体が E2 の PSBD (peripheral subunit binding domain) ドメインを介して E2 コアと会合することが知られている。*C. glutamicum* のアセチローム解析により、PSBD 領域内の Lys391 にアセチル化修飾が

見出された。興味深いことに、Lys391 の非アセチル化模倣変異 (K391R) 株は野生株およびアセチル化模倣変異 (K391Q) 株と比べてグルタミン酸生産が 10~20% 上昇しており、その原因について分子レベルでの解明を目指した。

まず K391 変異が PDH や ODH サブユニット会合に与える影響を調べたところ、CgE2 に対する CgE1o の結合には影響しないが、CgE1p および CgE3 の結合は K391Q 変異により阻害された (図 1)。次に K391 変異株および野生株より調製したライゼートを用いて、K391 変異が酵素反応パラメータに与える影響を評価した。K391Q 変異は  $V_{max}$  を低下させ、その影響は ODH 反応より PDH 反応の方が顕著であった。K391R 変異でも PDH 反応における  $V_{max}$  への影響が見られたが、K391Q 変異に比べると緩やかであった。興味深いことに、いずれの K391 変異でもピルビン酸や 2-オキソグルタル酸に対する  $K_m$  値が小さくなっていた。得られた酵素反応パラメータを元に低濃度 (1 mM) ピルビン酸条件での酵素活性を算出したところ、K391R 変異型の PDH 活性は K391Q 変異型や野生型よりも高くなることが判明した。K391R 変異株の培養上清中のピルビン酸量が野生株や K391Q 株よりも低くなっていた結果と併せて、K391R 変異型は低濃度ピルビン酸条件で効率よく働き、クエン酸回路への炭素フローが上昇したことがグルタミン酸生産の増加に繋がったと考えられた。以上の結果から、K391 はサブユニットの会合と活性に重要な残基であり、そのアセチル化は特に PDH 活性、さらにはグルタミン酸生産に影響を及ぼすことが示唆された。

## 結論

本研究により、*C. glutamicum* のユニークな PDH-ODH ハイブリッド複合体の構造と機能の一端が明らかとなった。少ないサブユニット数で構成されるコンパクトな複合体であるからこそ、サブユニット会合変化が 2 つの酵素活性のバランスに影響を及ぼしやすく、中心炭素代謝フローの制御に関わる可能性が考えられる。またアセチル化修飾はサブユニット会合を介して特に PDH 活性に影響を与え、さらにはグルタミン酸生産にも影響を及ぼすことが示唆された。

## 引用文献

- 1) Kinugawa H, Kondo N, Komine-Abe A, Tomita T, Nishiyama M, Kosono S. (2020) In vitro reconstitution and characterization of pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase hybrid complex from *Corynebacterium glutamicum*. *MicrobiologyOpen* **9**: e1113.
- 2) Komine-Abe A, Kondo N, Kubo S, Kawasaki H, Nishiyama M, Kosono S. (2021) Characterization of lysine acetylation in the peripheral subunit-binding domain of the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase-2-oxoglutarate dehydrogenase hybrid complex from *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **85**:874-881.