

「野田産研研究助成」
2024 年度「奨励研究助成」研究成果概要

酵素活性を持たない酵素ホモログによる代謝調節機構の解明

吉田 彩子

東京大学大学院農学生命科学研究科

研究の目的

CoA 転移酵素 (CoAT) は、脂肪酸に対してアシル CoA の CoA 部位を転移し、別のアシル CoA と脂肪酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。腸内細菌では酪酸などの短鎖脂肪酸生産に、哺乳類の関連酵素 Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase はケトン体代謝に関わるなど、脂肪酸代謝での重要性が知られている。したがって、その活性制御機構の解明は代謝調節の理解に直結する課題である。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において、CoAT は特定の培養条件において高度にアセチル化されるタンパク質として同定され、アセチル化などを介した活性制御機構が想定された。これまでの研究で、CoAT が「酵素活性を持たない酵素ホモログ (pseudoenzyme)」と相互作用し、この pseudoenzyme が NAD^+/NADH 比のセンサーとして機能することで、CoAT 活性が NAD^+/NADH 比依存的に調節されることを明らかにしている。本研究では、この pseudoenzyme を介した新規 CoAT 制御機構に着目し、その構造基盤と生理的意義を解明することを目的とした。

方法

CoAT・ADLP 複合体の構造解析

CoAT と相互作用する pseudoenzyme (以下 ADLP, alanine dehydrogenase-like protein) を介した制御機構の構造基盤を明らかにするため、CoAT・ADLP 複合体の構造解析を行った。まず、*T. thermophilus* 由来の CoAT および ADLP の組換えタンパク質を発現・精製し、両者から複合体を再構成した。ADLP は NAD^+ を結合した際に CoAT 活性を阻害することから、 NAD^+ の存在下および非存在下の複合体について X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡解析 (cryo-EM) を用いた構造決定を試みた。さらに、構造解析の結果から、 NAD^+ 結合による CoAT と ADLP の相互作用安定化が示唆されたため、等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて結合特性を解析した。

ADLP による CoAT 活性調節の生理的意義の解明

ADLP は NAD^+ と NADH の両方を結合するが、そのアフィニティーは異なり、 NAD^+/NADH 比依存的に CoAT 活性を調節する。この調節機構の生理的意義を明らかにするため、*T. thermophilus* の CoAT と ADLP の遺伝子破壊株を作製し、その生育解析を行った。また ADLP が CoAT 以外のタンパク質とも相互作用し、酸化還元状

態依存的な機能調節に関わる可能性を検証するため、アフィニティータグを付加した ADLP の高発現株を作製し、pull-down assay により相互作用タンパク質の探索を行った。

結果

CoAT の ADLP・NAD⁺による活性調節の構造基盤

まず CoAT・ADLP 複合体構造を X 線結晶構造解析により明らかにしようと試みたが、複合体結晶は得られず、ADLP 単体の結晶構造を決定した。典型的なアラニン脱水素酵素はヘキサマーを形成し、モノマーは基質結合ドメインとヌクレオチド結合ドメインから構成され、NAD(H)結合に伴い 2 つのドメインが閉じた構造へと変化することが知られている。これに対し、ADLP も同様のヘキサマーを形成し、NAD⁺結合部位も保存されていたが、NAD⁺結合型と非結合型の構造比較から、NAD⁺結合により開いた構造をとることが示され、この構造変化が CoAT との相互作用や活性調節に関与すると考えられた (図 1)。

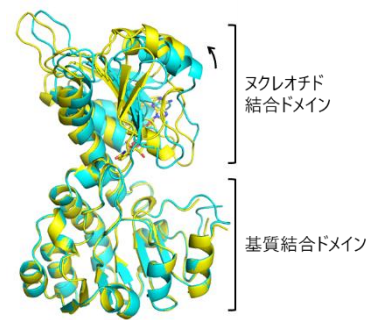


図 1. ADLP の構造変化
(黄色: NAD⁺結合型、
シアン: 非結合型)

続いて cryo-EM を用いた複合体の構造解析を行ったところ、NAD⁺存在下および非存在下でそれぞれ 2.26 Å、2.69 Å 分解能での構造決定に成功した (図 2)。いずれの構造においても、中央に ADLP のヘキサマーが位

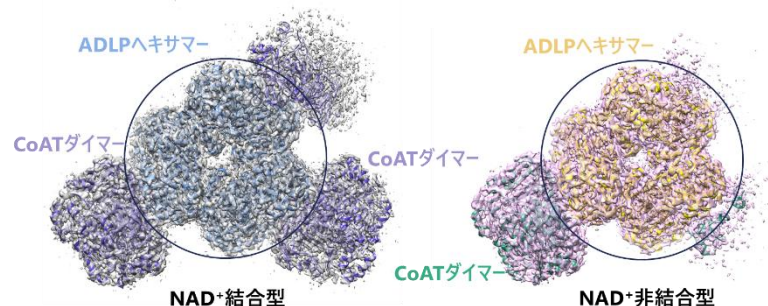


図 2. CoAT・ADLP 複合体の cryo-EM 構造

置し、その周りに CoAT ダイマーが結合していた。最大の違いは、ADLP ヘキサマーに対して結合する CoAT ダイマーの数であり、NAD⁺結合型では 2 分子が明瞭に観察され、3 分子目についても部分的にモデル構築できたのに対し、非結合型では 1 分子のみであった。このことから、ADLP への NAD⁺結合が CoAT との相互作用を安定化することが示唆された。ITC 解析でも、NAD⁺の存在下と非存在下での CoAT に対する ADLP の K_d はそれぞれ 34 nM、806 nM と大きく異なり、NAD⁺依存的に相互作用が強化されることが裏付けられた。

ADLP ヘキサマーは 3 つのダイマーからなり、ADLP ダイマーが CoAT ダイマーと相互作用していた。特に ADLP の基質結合ドメインとヌクレオチド結合ドメインの間に形成されるクレフト領域に、CoAT のループ領域が入り込むように結合していた。さらに、cryo-EM 構造でも NAD⁺結合に伴う ADLP の構造変化が観察され、この変化が CoAT との相互作用を安定化することが支持された。一方、2 つの複合体中の CoAT

自身の全体構造には顕著な違いは見られなかった。CoAT は触媒反応の過程で open-closed の構造変化を必要とするといわれており、ADLP との安定な相互作用により CoAT の構造柔軟性が制限され、結果として酵素活性が阻害されると考えられた。

CoAT や ADLP の *in vivo* 機能解析

CoAT 活性調節の生理的意義を検証するため、CoAT と ADLP の遺伝子破壊株の生育を解析した。 Δ CoAT 株は酪酸を単一炭素源とした培地条件で生育遅延を示したのに対し、 Δ ADLP 株は試した条件では野生株と顕著な差は見られなかった。ADLP は NAD^+/NADH 比のセンサーとして機能すると考えられることから、この比を大きく変化させる培地条件では表現型が現れる可能性があると考えている。ADLP の pull-down assay においては CoAT 以外の結合パートナーは見出されず、ADLP は主として CoAT の制御因子として機能することが示唆された。

結論

本研究により、pseudoenzyme である ADLP が NAD^+/NADH 比に応じて CoAT 活性を制御する新規な分子機構の構造基盤が明らかとなった。すなわち、 NAD^+ 結合に伴う ADLP の構造変化が CoAT との相互作用を安定化し、その結果として CoAT の構造柔軟性が低下することで、CoAT 活性が NAD^+ 依存的に阻害されるというものである。さらに、これまでに我々はアセチル化修飾を受けた CoAT では ADLP $\cdot\text{NAD}^+$ による阻害効果が緩和されることも見出している。これらの結果から、ADLP は β 酸化経路で生じるアシル CoA のフラックスを、 NAD^+/NADH 比やアセチル CoA 濃度に応じて CoAT 活性を調節することで制御し、細胞内の脂肪酸代謝やエネルギー代謝の調節に関与していることが示唆される。このことは、CoAT が代謝のキーポイントに位置していることを示すとともに、他の生物種においても代謝状態に応答した類似の制御機構が存在する可能性を示唆する。

また本研究は、酵素機能は失いながらも基質や補酵素の結合能を維持する pseudoenzyme が、他の酵素の制御タンパク質として機能する例を示したものである。我々は以前、*T. thermophilus* の炭素-窒素代謝をつなぐ重要な酵素であるグルタミン酸脱水素酵素において、2 つの pseudoenzyme を介したロイシンや AMP による活性調節について報告しており¹⁾、pseudoenzyme を介した代謝酵素の活性調節機構が普遍的であることが示唆される。今後、調節因子としての pseudoenzyme の探索・同定を行うことで、未知の代謝調節機構の解明につながることを期待される。

文献

- 1) Tomita, T., Matsushita, H., Yoshida, A., Kosono, S., Yoshida, M., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2019) Glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* is activated by AMP and leucine as a complex with catalytically inactive adenine phosphoribosyltransferase homolog. *J. Bacteriol.* **201**: e00710-18.