

博士論文

リジン生合成に関わるアミノ酸キナーゼの  
制御および機能発現に関する構造生物学的研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科  
応用生命工学専攻 平成 20 年度進学

吉田 彩子

指導教員 西山 真 教授

# 目次

第一章 序論 .....	3
1-1 緒言 .....	3
1-2 リジン生合成経路の多様性 .....	6
1-3 工業的リジン発酵 .....	13
1-4 アミノ酸キナーゼファミリー .....	16
1-5 本研究の目的 .....	22
1-6 本論文の構成 .....	23
第二章 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 由来のアスパラギン酸キナーゼのβサブユニットの構造解析 .....	24
2-1 背景と目的 .....	24
2-2 方法 .....	29
2-3 結果 .....	34
2-4 考察 .....	42
第三章 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 由来のα <sub>2</sub> β <sub>2</sub> 型アスパラギン酸キナーゼの活性制御機構の解析 .....	51
3-1 背景と目的 .....	51
3-2 方法 .....	53
3-3 結果 .....	57
3-4 考察 .....	66
第四章 <i>Thermus thermophilus</i> 由来のアスパラギン酸キナーゼの活性制御機構及び熱安定性の解析 .....	76
4-1 背景と目的 .....	76
4-2 方法 .....	77
4-3 結果 .....	83
4-4 考察 .....	92

第五章 <i>Thermus thermophilus</i> のリジン生合成酵素 LysZ とキャリアタンパク質 LysW の機能	
構造解析.....	100
5-1 背景と目的.....	100
5-2 方法.....	102
5-3 結果.....	111
5-4 考察.....	131
第六章 総括と展望.....	139
参考文献.....	143
謝辞.....	153

# 第一章 序論

## 1-1 緒言

我々ヒトをはじめ、微生物、植物など全ての生物において、細胞内では生命活動を維持するために代謝システム、DNA の複製や転写システム、また細胞分裂や環境適応システムを持つと同時にそれぞれの厳密な調節ネットワークを備えている。これらのシステムは全てそれぞれの生物のゲノム上に設計されており、遺伝子から転写、翻訳を経て生産されるタンパク質による複雑なネットワークによって構成されている。多くの研究者がこのような遺伝子やタンパク質の機能、そしてそれぞれの間の相互作用ネットワークを明らかにし、生物全体を理解しようと研究を行っている。一方でこれらのシステムは全てがゲノム上に記されていることから、そのゲノムを決定することが細胞内、ひいては生物内の全てのシステムを解明することに直結するという考えから、ヒトをはじめとして様々な生物で20年ほど前からゲノムプロジェクトが進行している。今日ではこのゲノムプロジェクトにより多くの生物の全ゲノム配列が解読され一般に公開されており、さらには、次世代シーケンサーの発達によりゲノムサイズの小さなバクテリアなどでは一研究者が短時間でドラフトゲノムシーケンスを手に入れることができる。しかしながら現状では、ゲノム配列の解読は確かに生物の設計図を我々に示すことになったが、我々の生物に関する知識があまりに不足しており、それだけではその生物が細胞中でどのようなシステムを用いているかを理解することができていない。多くのゲノム情報が明らかにされるにつれて、逆に個々の遺伝子やタンパク質の持つ機能や制御を解析していく、所謂ポストゲノム研究の重要性がさげられる結果となっている。ポストゲノム研究といっても実験科学者が行うことは、一つの事象に対してある仮説を立て、実験により実証していくことで昔と変わらない。しかし、以前に比べて多種多様な情報が蓄積しているのに加え、すでにデータベース上にある情報を利用するバイオインフォマティクスの手法が広く利用可能になっており、より正解に近い仮説を立てやすくなっている。最近では DNA マイクロアレイや MALDI-TOF/MS などの分析技術の飛躍的な発展によってゲノミクスやプロテオミクスなどと呼ばれる細胞内の DNA やタンパク質、代謝産物などの網羅的解析がよく行われるようになってきている。このような解析により生じる膨大なデータの処理にもバイオインフォマティクスは活躍しており、(コンピュータ上で)生物内の DNA やタンパク質のネットワークの全てを理解しようとするシステム生物学と呼ばれる分野も発展しつつある。このような生物を全体と

してとらえる研究は、生物や生命現象の普遍性を追求する学問領域として位置付けることができ、近い将来我々が目指すべき重要な研究の方向性を指し示すものとして高く評価される。また、その一方では生物には多様性があるのにもかかわらず、それを普遍性という単一のフィルターを通してみることは大変危険である。例えば、ゲノム配列に基づいたアノテーションを信じてしまうと、同じような配列やドメインをまったく別の代謝反応や化合物の受容体として用いていることがあるときに見逃してしまう可能性がある。より多くの詳細なデータが蓄積されることで、数十年後にはそのような多様性も含めた生体システムの全体像、あるいは生物機能を推測することができるようになるかもしれないが、少なくとも現在はデータベースを完全に信じるのではなく上手く利用することにとどめ、個々の事象に対してより正解に近い仮説を立て実験的に立証することの必要性が、生物の多様性を示し、また生物全体を理解するためのデータベースに寄与する意味でも、従来以上に高まっていると思われる。

タンパク質がその機能を発現するにあたり重要となるのがその立体構造の形成である。全てのタンパク質があるアミノ酸配列を持ち、ある決まった立体構造を持つことで、酵素であれば基質などの決まった構造を持つ化合物などを認識し、活性を持つこととなる。それゆえ、タンパク質の機能を解明するためには立体構造情報の取得が重要となる。今日では、大腸菌をはじめとする異種の宿主でのタンパク質発現技術の進歩や NMR や X 線結晶構造解析などの立体構造解析技術の発展により、以前より容易に立体構造を解明することができるようになった。具体的には、高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory や SPring-8 という大型放射光施設におけるビームラインの X 線強度の増大や微小結晶に特化したビームラインの建設、データ解析のためのプログラムの操作性の向上などが結晶構造解析の敷居を大きく下げている。このような技術発展により、以前は高度な専門性が要求された結晶構造解析だが、構造解析の原理を必ずしも正確に理解していなくても良質の結晶さえあれば研究室に配属したての学生でもタンパク質立体構造を決定することが可能となっている。現在、Protein Data Bank (PDB) には多くの立体構造情報が登録されており、データベース内のタンパク質構造の比較からアミノ酸配列の相同性は低いながらもほぼ同じトポロジーを持つという共通のドメインなどが見つかっている。様々な生物種間、タンパク質間で保存されたドメインの機能との関連性を調べることは進化的にも興味深い。一方で、結晶構造は分子のある状態を切り取ったスナップショットでしかないというのも事実である。タンパク質は、反応の進行や、基質や阻害剤などのエフェクターの結合によって様々なコンフォメーションをとっており、そのような可動性のあるタンパク質の詳細な分子機構を明らかにするためには、より多くの状

態のスナップショットの相互比較に加え、生化学的な解析を行うことが非常に重要となる。結晶構造解析に加え、生化学的、物理化学的な解析を行い、タンパク質の性質や機能を多面的に知ることが、詳細な分子機構の理解には必要だろう。そして、タンパク質情報の蓄積によって *in silico* でのシミュレーションや構造予測の精度が向上され、それにより得られた情報による機能改変などが行われるであろう。また、近年では「夢の光」といわれる X 線自由電子レーザー (XFEL; X-ray Free Electron Laser) 計画が進行中であり、この光源が実用化すればタンパク質を結晶化することなく、原子レベルの大ききで、瞬時の動きを観察することが可能になるといわれている。そうすれば、現在結晶化が困難で解析が難しいといわれている膜タンパク質などの構造解析も可能となり、構造生物学という分野が益々発展していくものと考えられる。近い将来現在以上のタンパク質の構造情報が簡単に手に入るようになったときには、それら構造情報をどのように解釈しどのように利用していくかということが、より重要となってくるだろう。

## 1-2 リジン生合成経路の多様性

リジンはヒトなどの高等動物では食物として外から取り入れなければならない必須アミノ酸の一つであるが、微生物や植物はリジンを生合成することができる。その生合成経路は生物種によって多様性があり、一般にバクテリアや植物ではアスパラギン酸を初発物質としてジアミノピメルン酸(DAP; Diaminopimelate)を経由する DAP 経路(Fig. 1-1)でリジンを生合成する[1, 2]ことが知られている一方、カビや酵母では、2-オキソグルタル酸(2-OG; 2-Oxoglutarate)を初発物質として $\alpha$ -アミノアジピン酸(AAA;  $\alpha$ -aminoadipate)を経由する AAA 経路(Fig. 1-2)でリジンを生合成する[3-5]。さらに、DAP 経路では中間体である Tetrahydrodipicolinate(THDPA)から DAP までの変換の過程に多様性が見られる。また、後に詳しく述べるが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は真正細菌でありながら、AAA を経由してリジンを生合成し、その生合成経路はカビや酵母の AAA 経路とは異なることが明らかとなっている[6-8]。これらの DAP 経路と *T. thermophilus* における新規 AAA 経路の AAA 以降の反応を担う酵素にはその基質は違いながらも同じような反応を行う酵素が存在すること、またアルギニン生合成経路でも同じような酵素を用いて反応を進めていることから、これらの 3 つの経路間には進化的に関連があると考えられている[9, 10](Fig. 1-3)。また、カビや酵母、及び *T. thermophilus* の AAA 経路の 2-OG から AAA までの変換を担う酵素は Tricarboxylic acid(TCA) サイクルやロイシン生合成経路の酵素と相同性を持つことから、これらも進化的に関連のある酵素であることが示唆されている。リジン生合成経路のように生物種によって多様性があり、その他の代謝経路の酵素と相同性を持つアミノ酸代謝経路は珍しく、アミノ酸生合成経路の進化を理解するのに適した研究対象である。また、これらのリジン生合成経路はそれらを持つ生物にとってリジンや細胞壁の構成成分である DAP を合成する生育に必要な経路であり、それと同時にヒトなどの高等動物には存在しないことから、抗生物質の標的にもなりうる。さらに、他のアミノ酸生合成経路にもみられるようにこれらのリジン生合成経路でも生産量調節のため、最終産物による初発酵素や経路の分岐点に存在する酵素に対するフィードバック制御が存在する[11-14]。

### 1-2-1 DAP 経路

一般にバクテリアや植物、藻類ではリジンを DAP 経路で生合成する(Fig. 1-1)。アスパラギン酸を初発物質とし、2段階の反応によって Aspartate semialdehyde を生成する。続いて起こ

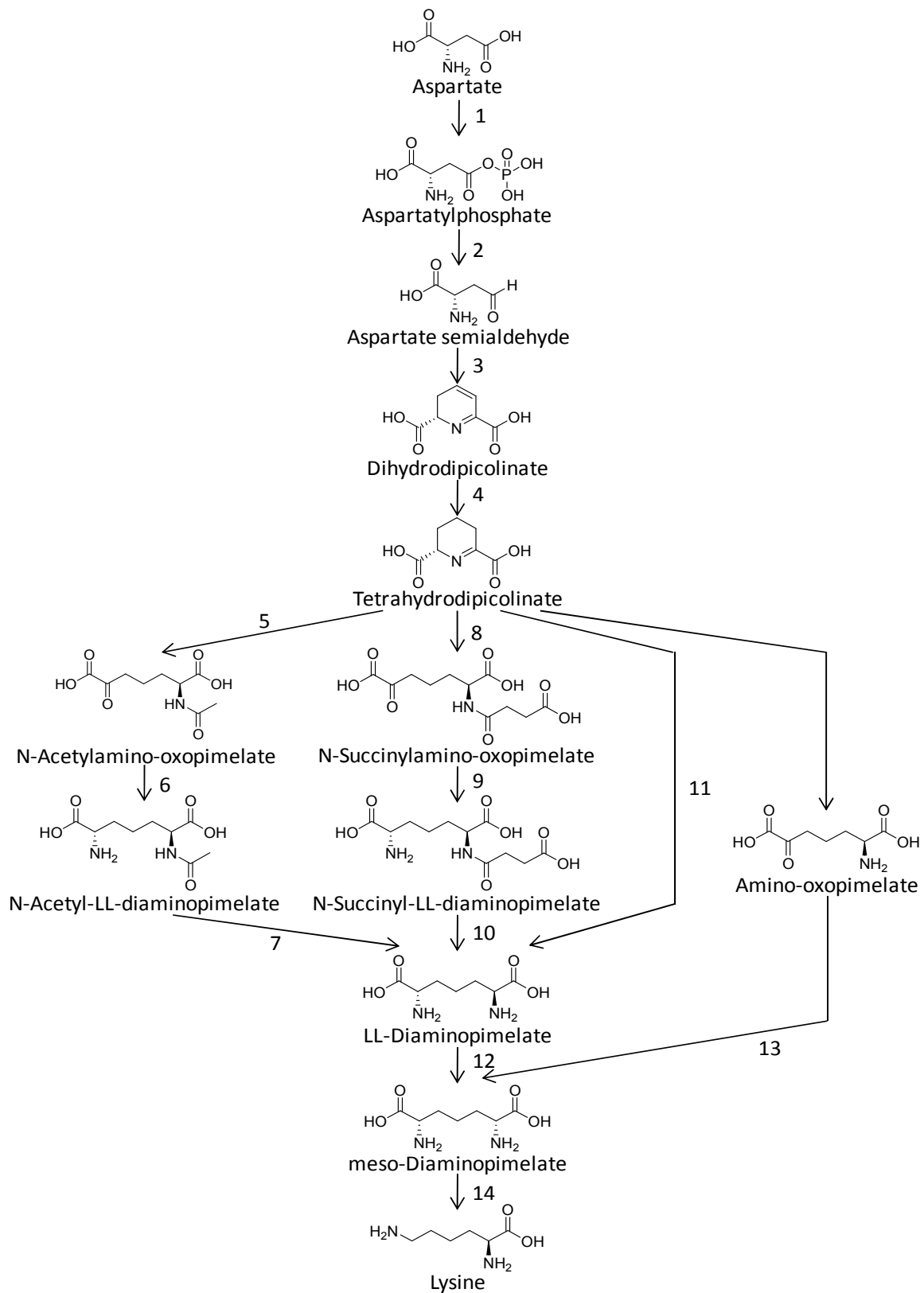


Figure 1-1 DAP 経路

1; Aspartate kinase, 2; Aspartate semialdehyde dehydrogenase, 3; Dihydrodipicolinate synthase,  
 4; Dihydrodipicolinate reductase, 5; Tetrahydrodipicolinate *N*-acetyltransferase,  
 6; Acetyl-diaminopimelate aminotransferase, 7; *N*-Acetyldiaminopimelate deacetylase,  
 8; Tetrahydrodipicolinate *N*-succinyltransferase, 9; *N*-Succinyldiaminopimelate aminotransferase,  
 10; Succinyldiaminopimelate desuccinylase, 11; LL-Diaminopimelate aminotransferase,  
 12; Diaminopimelate epimerase, 13; Diaminopimelate dehydrogenase, 14; Diaminopimelate decarboxylase



る L-2,3-Dihydropicolinate を生成するステップで DAP やリジンへの流量を調節している。THDPA までは共通の 4 つの酵素によって変換されるが、その後の DAP までの変換経路はこれまでに 4 種類存在することが知られている[15, 16]。THDPA のアミノ基をアセチル基またはスクシニル基によって保護し、N-Acyl-LL-2,6-diaminopimelate を経由する経路、THDPA から meso-DAP までを DAP dehydrogenase による触媒反応で変換する経路、さらに最近 *Arabidopsis thaliana* で見つかった THDPA から LL-DAP への変換を DAP aminotransferase で行う経路の 4 種である。DAP からリジンへの変換は DAP decarboxylase (*lysA*) によって触媒される。また、アスパラギン酸から Aspartate kinase (AK) と Aspartate semialdehyde dehydrogenase (ASADH) によって Aspartate semialdehyde に変換される過程はメチオニンやスレオニン、イソロイシン生合成経路で共通に使われる。DAP 経路の中間体である meso-DAP やリジンはそれぞれグラム陽性細菌、グラム陰性細菌の細胞壁のペプチドグリカン層の構成因子であることから、この経路の酵素を標的とした阻害剤の探索研究も行われている[17]。

#### 1-2-2 カビや酵母における AAA 経路

カビや酵母では DAP ではなく AAA を経由してリジンが生合成される (Fig. 1-2)。AAA までの前半の経路では 2-オキソグルタル酸 (2-OG) を初発物質として、5 段階の反応によって変換される。これらの酵素は TCA サイクルにおけるオキサロ酢酸から 2-OG までの経路や 2-オキソイソ吉草酸 (2-Oxoisovalerate) を初発物質とするロイシン生合成の酵素と、機能やアミノ酸配列で関連がある (Fig. 1-3)。AAA からリジンへの変換はアデニル化を経てセミアルデヒドを生成し、サッカロピン (Saccharopine) を経由する 4 段階の反応で達成される。

#### 1-2-3 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるリジン生合成経路

*Thermus thermophilus* は 70 °C を至適生育温度として好気条件下で生育する高度好熱性細菌である。これまでに当研究室においてこの *T. thermophilus* がリジンを DAP ではなく AAA を経由して生合成することを明らかにしてきた (Fig. 1-2) [18-22]。 *T. thermophilus* における新規 AAA 経路においても AAA までの前半の経路はカビや酵母の AAA 経路と同様に 2-OG を初発物質として、TCA サイクルやロイシン生合成経路中の酵素と相同性を持つ酵素群によって構成されている。一方で、AAA からリジンへの変換はカビや酵母のようにサッカロピンを経由せず、アルギニン生合成経路の酵素と相同性を持つ酵素群 (LysX、LysZ、

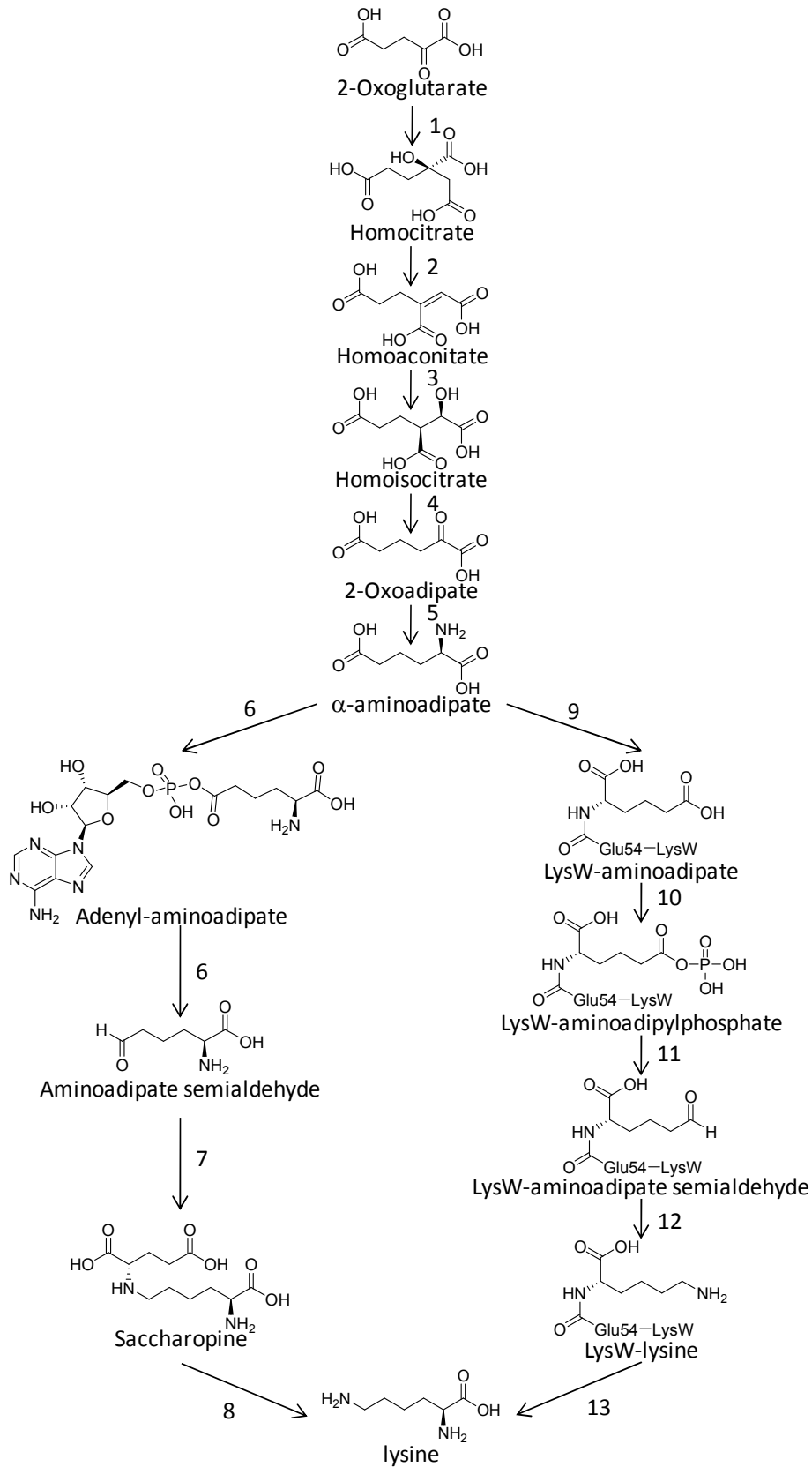


Figure 1-2 AAA 経路

1; Homocitrate synthase, 2; Homoaconitase, 3; Homoaconitase (LysTU),  
 4; Homoisocitrate dehydrogenase, 5;  $\alpha$ -aminoadipate aminotransferase,  
 6;  $\alpha$ -aminoadipate semialdehyde dehydrogenase, 7; Saccharopine dehydrogenase (Lys9),  
 8; Saccharopine dehydrogenase (Lys1), 9; LysX, 10; LysZ, 11; LysY, 12; LysJ, 13; LysK

LysY、LysJ、LysK)によって行われる(Fig. 1-3)。アルギニン生合成経路の初発物質であるグルタミン酸と AAA は炭素鎖 1 つの違いしかなく、生成物であるオルニチンとリジンも同様の違いがあることから、*T. thermophilus* のリジン生合成経路ではアルギニン生合成経路と同じように AAA の $\alpha$ -アミノ基をアセチル基などで保護することで反応が進むと考えられてきた。しかし、AAA 以降の経路の第一番目の酵素である LysX はアルギニン生合成経路の初発酵素である ArgA (*N*-Acetylglutamate synthase)と相同性を示さず、アセチル基やスクシニル基などを AAA の $\alpha$ -アミノ基の保護基として用いることはできなかった。最近、この LysX が、ゲノム上で *lysX* のすぐ上流にコードされる 54 アミノ酸からなる小さな酸性タンパク質、LysW を保護基として AAA の $\alpha$ -アミノ基に付加して反応を進めていくことが示された[23]。LysW は C 末に高度に保存された EDWGE という 5 アミノ酸からなる配列を持っており、LysX は C 末端のグルタミン酸残基の側鎖カルボキシル基と AAA の $\alpha$ -アミノ基のペプチド結合の形成を ATP (Adenosine triphosphate) 依存的に触媒する(Fig. 1-4A, B)。また、LysW は酸性タンパク質であり、最後に LysK の反応によって切り離されるまで保持されることから、各酵素と静電的に相互作用し、効率よくリジンを生合成するためのキャリアタンパク質としての機能を持つことも示唆されている。

さらに、この LysX や LysW ホモログを有するリジン生合成遺伝子クラスターが古細菌を中心に存在することが分かっている(Fig. 1-4C)。*Sulfolobus* 属ではリジン生合成クラスター中だけでなくアルギニン生合成クラスター中にも LysX ホモログを持ち(ArgX)、アルギニン生合成においてもグルタミン酸の $\alpha$ -アミノ基の保護に LysW を用いることが示されつつある。さらに、LysX 以下の LysZ、LysY、LysJ、LysK ホモログを *T. thermophilus* ではアルギニン生合成経路の ArgB、ArgC、ArgD、ArgE としてもう 1 組持っているが、*Sulfolobus* 属のゲノム上にはリジン生合成クラスター中にも 1 組しか存在していない。つまり、LysX より後の反応をリジンとアルギニン生合成で共通に利用している可能性が示唆されている(大内拓也 平成 22 年度修士論文)。Woese ら[24]によって提唱された 16/18S rRNA に基づく進化系統樹において始原生物(LCA; last common ancestor)に近いとされる好熱性細菌や超好熱性古細菌などに LysW を保護基として用いるリジン生合成クラスターが存在し、さらにはアルギニン生合成においても働く bifunctional な酵素が存在することから、この AAA を介する新規リジン生合成経路が LCA の持つ multifunctional な一次代謝経路に近い存在であると考えられ、アミノ酸生合成経路の進化を考える上で大変重要な経路であるといえる。

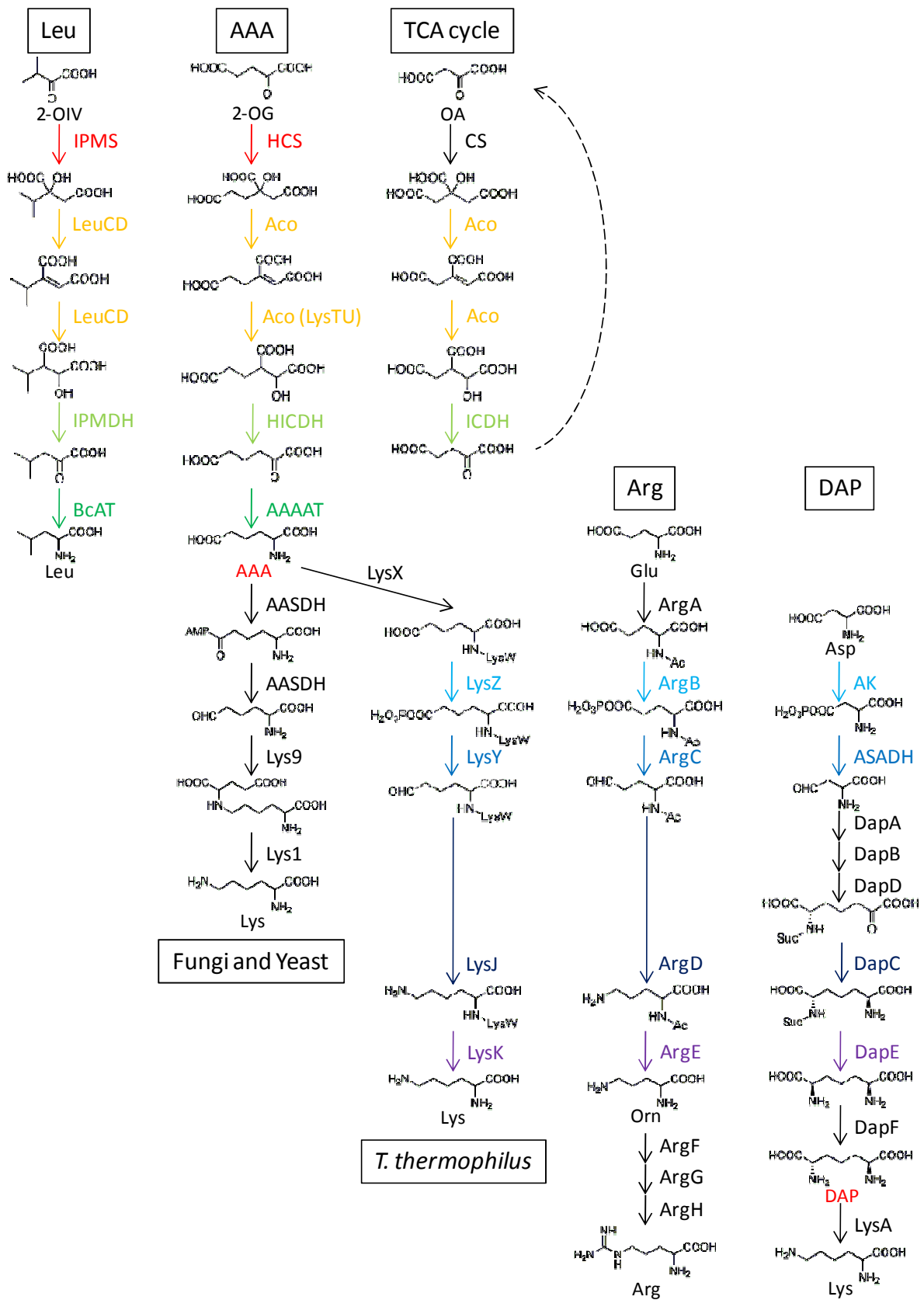


Figure 1-3 リジン生合成経路と他の一次代謝経路との類似性  
同じ色で示した酵素は同様の反応を触媒するパラログである。

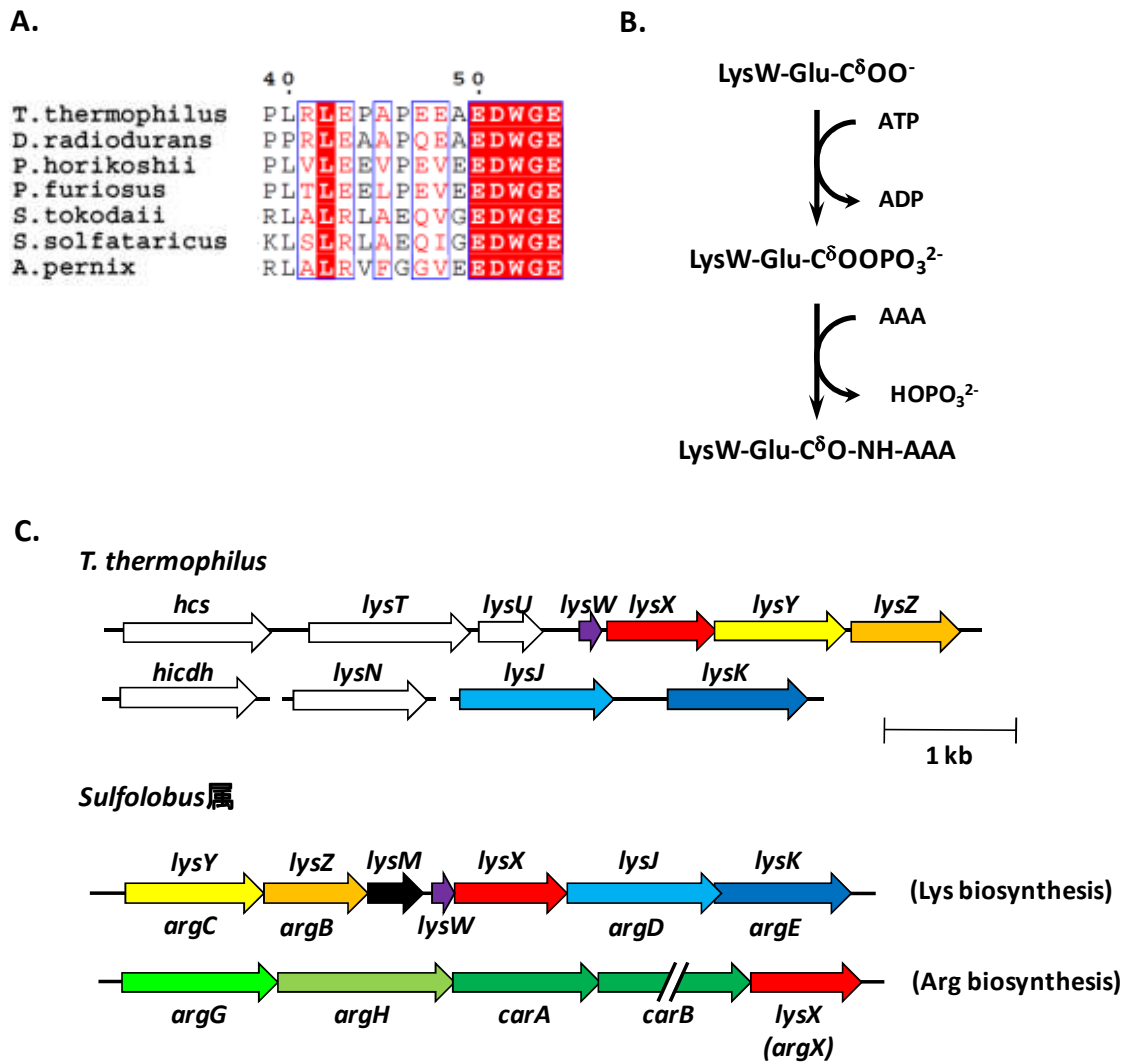


Figure 1-4 *T. thermophilus* の新規リジン生合成系

- A. LysW の C 末端残基の保存性
- B. LysX による AAA の  $\alpha$ -アミノ基と LysW の Glu54 の ATP 依存的なリガーゼ反応
- C. *T. thermophilus* のリジン生合成遺伝子クラスター及び、*Sulfolobus* 属のリジン・アルギニン生合成遺伝子クラスター

### 1-3 工業的リジン発酵

アミノ酸は様々な用途に広く応用されている。グルタミン酸ナトリウムやグリシンは調味料などの食品添加物として、リジンやスレオニン、トリプトファン、メチオニン等の必須アミノ酸は家畜飼料への添加物として用いられている。この他にもフェニルアラニンとアスパラギン酸は人工甘味料(アスパルテーム)として利用されていたり、多くのアミノ酸が代謝異常疾患の患者のための栄養剤やサプリメント、化粧品や日用品の原材料となっていたりする。これら産業上有用なアミノ酸は古くはタンパク質を加水分解して生産されていたが、現在では多くのアミノ酸が細菌による発酵法によって生産されている。この微生物発酵法によるアミノ酸生産は 1950 年代から日本で開発され、工業的に利用されるようになった我が国を代表する産業の一つである。

リジンは家畜の食餌への添加物としての役割が大きい。家畜には主に安価な小麦やトウモロコシなどを与えているが、これらの穀物飼料では必須アミノ酸のバランスが悪く、特にリジンの割合が必要量に対して低い。この問題を解消するため、結晶リジンを飼料に添加して家畜に与えているのである。現代の人口増加による食肉需要の増大により、リジンの工業的生産量は年間 100 万トンを超える勢いである。リジンは多量のグルタミン酸を培地中に分泌する菌としてスクリーニングにより単離された *Corynebacterium glutamicum*[25]による発酵法によって生産される。*C. glutamicum* ではリジンをアスパラギン酸を初発物質として用いる DAP 経路で生合成する。このアスパラギン酸を初発物質とする経路において、はじめの 2 段階で生成する Aspartate semialdehyde 以降は、リジンに向かう経路とスレオニン及びメチオニンを生成する経路に分岐する(Fig. 1-5)。このアスパラギン酸ファミリーアミノ酸(リジン、スレオニン、メチオニン)生合成経路ではアミノ酸生産量の調節のため、経路の初発酵素であるアスパラギン酸キナーゼ(AK; Aspartate kinase)や分岐点である Dihydrodipicolinate synthase や Homoserine dehydrogenase が最終産物によるフィードバック制御を受けることが知られている[26-28]。アミノ酸生産菌の育種において初期に用いられたのは紫外線照射やニトロソグアニジン(NTG)などの変異剤を与えることによる変異育種である。得られた変異株からアナログ耐性や栄養要求性等を指標にスクリーニングが行われ、リジンアナログである S-2-Aminoethyl L-cysteine(AEC)への耐性を示す変異株のスクリーニングによって、AK のフィードバック阻害耐性株が取得されている[29, 30]。このほか、発酵の原料となるグルコースからアスパラギン酸を供給する経路である解糖系や TCA サイクルの酵素に導入された変

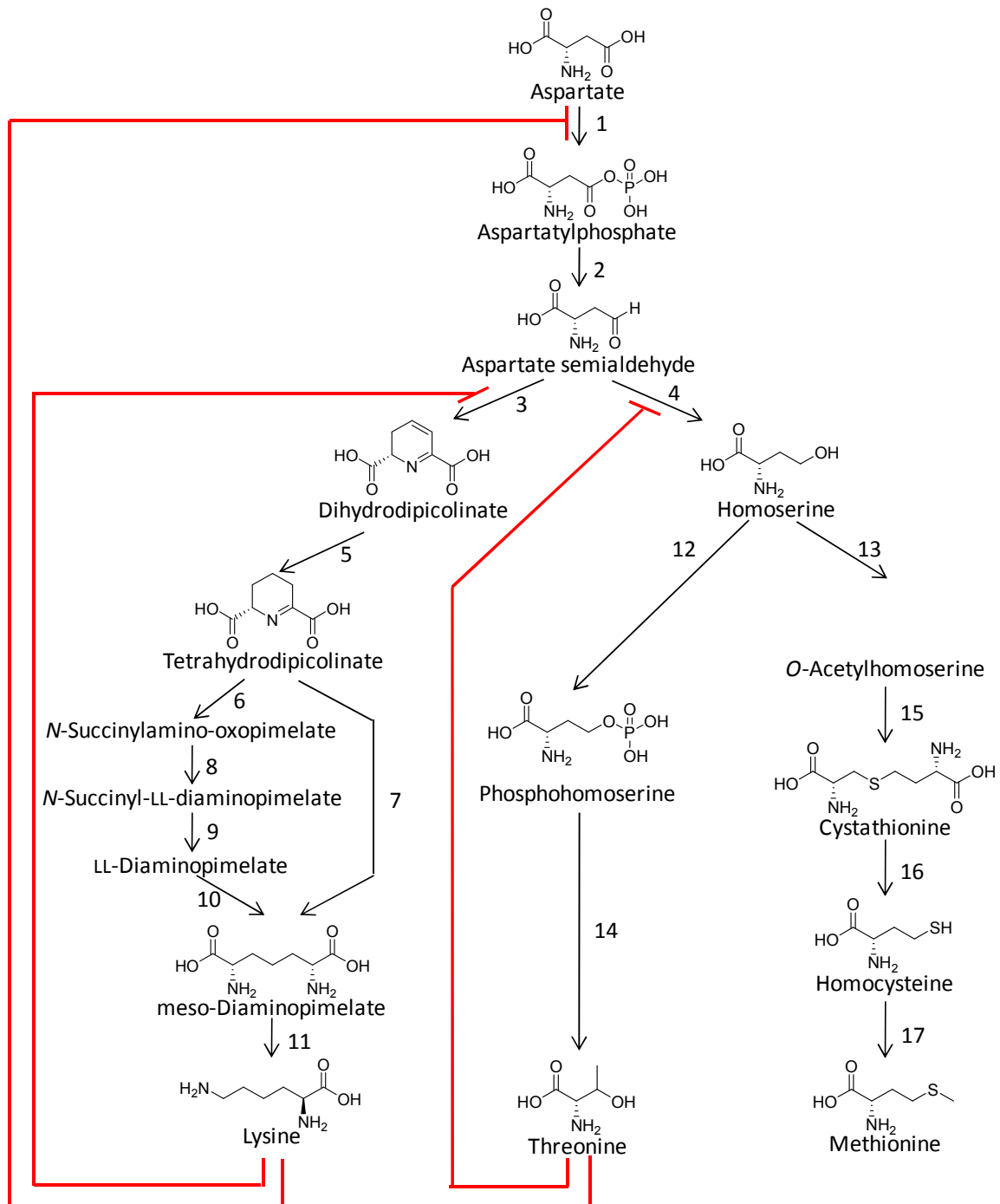


Figure 1-5 *Corynebacterium glutamicum* のアスパラギン酸ファミリーアミノ酸生合成経路  
(赤線はフィードバック阻害を示す)

- 1; Aspartate kinase, 2; Aspartate semialdehyde dehydrogenase 3; Dihydrodipicolinate synthase,  
4; Homoserine dehydrogenase, 5; Dihydrodipicolinate reductase,  
6; Tetrahydrodipicolinate *N*-succinyltransferase, 7; Diaminopimelate dehydrogenase,  
8; *N*-Succinyldiaminopimelate aminotransferase, 9; Succinyldiaminopimelate desuccinylase,  
10; Diaminopimelate epimerase, 11; Diaminopimelate decarboxylase, 12; Homoserine kinase,  
13; Homoserine acetyltransferase, 14; Threonine synthase, 15; Cystathionine  $\gamma$ -synthase,  
16; Cystathionine  $\beta$ -lyase, 17; Homocysteine methyltransferase

異がリジン高生産をもたらすということも分かっている。さらに、1980年代後半から1990年代にかけては宿主 *C. glutamicum* で用いることのできるベクター系が開発されるなどの遺伝子操作手法が発展し、生合成酵素や排出の活性の強化、代謝制御の解除などに用いられ、より効率的にリジンを生合成する生産菌が得られてきた[31, 32]。また、2003年には *C. glutamicum* のゲノム配列が解読され[33, 34]、野生株とリジン高生産変異株とのゲノムを比較し、リジン高生産に有効な変異のみを導入した効率的な高生産株の創出が試みられている[35, 36]。また最近では、トランスクリプトーム解析を用いてリジン生産量改善のための新たなターゲットとなる遺伝子や酵素の探索もなされている[37]。

このような育種技術の発展によって得られたリジン高生産 *C. glutamicum* 変異株が現在の工業的リジン発酵において用いられている一方、この生産株育種の過程で明らかになったアミノ酸生合成経路におけるフィードバック制御などの詳細なメカニズムについては深く研究されてこなかった。今後は個々の酵素やトランスポーターなどの触媒機構や活性制御機構、排出機構を解析することで、これまでに取得されている変異株よりもリジン生産能に優れた変異体(株)の創製が可能になると考えられる。飼料用などまだまだ需要の拡大が予想されるリジンの生産量改善に、このような基礎研究が重要となるであろう。



## 1-4 アミノ酸キナーゼファミリー

アミノ酸キナーゼファミリー (AAK family; Amino acid kinase family, Pfam; PF00696) は主にアミノ酸を基質としてそのカルボキシル基の ATP によるリン酸化を行うキナーゼファミリーである。AAK family の酵素は特徴的な $\alpha\beta\alpha$  sandwich fold を持っており、N 末側の残基によって構成される $\alpha$  helix からなる N-lobe と C 末側の残基によって構成される C-lobe に分けられる (Fig. 1-6)。N-lobe にはリン酸化される基質が、C-lobe には ATP がそれぞれ結合する。このファミリーに含まれる酵素はリジン生合成経路のアスパラギン酸キナーゼ (AK) [38] やアルギニン生合成経路の *N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ (NAGK; *N*-Acetylglutamate kinase) [39]、プロリン生合成経路のグルタミン酸-5-キナーゼ (G5K; Glutamate-5-kinase) [40] などがある。また、アミノ酸を基質とするもの以外にも、アルギニンの分解により生じるカルバモイルリン酸 (Carbamoyl phosphate) と ADP から ATP と Carbamate を合成する反応を可逆的に触媒する Carbamate kinase (CK) [41] やそれとは逆にピリミジンやアルギニンの前駆体となる Carbamoyl phosphate を炭酸水素とアンモニア、ATP から合成する Carbamoyl phosphate synthetase (CPS) [42]、またピリミジンヌクレオチド生合成系における UMP kinase (UMPK) [43] などが AAK family と同様な立体構造を有する。ここに挙げたアミノ酸キナーゼ、及びそのホモログではそれぞれ、生育に必須な代謝経路上の律速酵素となっていることが多く、フィードバック阻害などを受けるものも存在する。さらに、AK や G5K で見られるように AAK ドメイン以外に活性制御に関わる別のドメインを持つ酵素や、それとは逆にアルギニン生合成経路の初発酵素でありアルギニンによってフィードバック阻害を受ける *N*-Acetylglutamate synthase (NAGS) では AAK ドメインをアルギニンの結合とそれによる構造変化を Acetyltransferase domain へと伝える制御ドメインとして持つ [44] など、多様性に富んでいる。ここでは、AAK family の中で代表的な AK と NAGK について紹介する。

### 1-4-1 アスパラギン酸キナーゼ

アスパラギン酸キナーゼ (AK) は前述してきたように、アスパラギン酸を初発物質としてリジン、スレオニン、メチオニンのアスパラギン酸ファミリーアミノ酸生合成経路の初発酵素であり、ATP を用いて Aspartyl phosphate を生成する反応を触媒する。AK はこの生合成経路の鍵酵素であり、他のアミノ酸生合成経路にみられるように最終産物であるリジンやスレオニンによってフィードバック阻害を受けることやメチオニンが AK の転写抑制をすることが知られてい

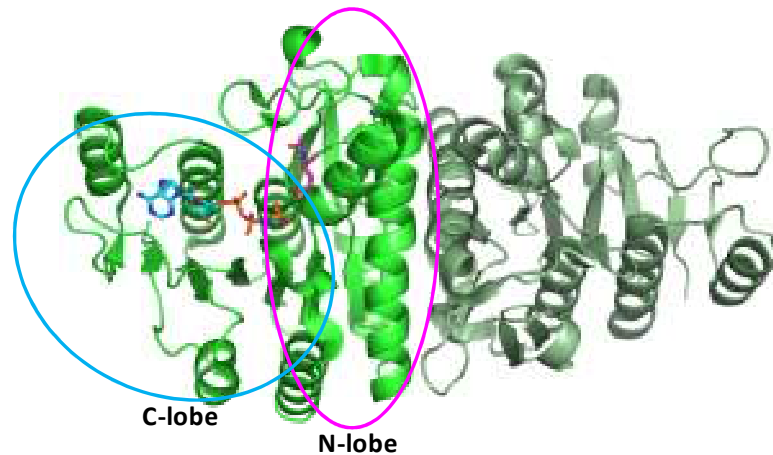


Figure 1-6 Amino acid kinase の代表的な構造 (*E. coli* 由来 NAGK (PDB ID; 1GS5))  
stick model は *N*-acetylglutamate (magenta) と AMPPNP (cyan)

る[45]。例えば、*Escherichia coli* には 3 種類の AK のアイソザイムが存在し、Homoserine dehydrogenase との融合タンパク質である AKI-HSDHI はスレオニンによって、AKIII はリジンによってフィードバック阻害を受け、AKII-HSDHII はメチオニンによって転写が抑制される [11]。このように、1 つの生物の中でいくつかのアイソザイムを持ち、それぞれが異なるアミノ酸によって酵素活性や転写を制御されることで、3 つのアミノ酸の生産量を調節している (Table 1-1)。一方で、*T. thermophilus* は AK を 1 つしか持たず、スレオニンによってフィードバック阻害を受ける[46]。*T. thermophilus* ではリジンを AK の関与しない AAA 経路で生成し、そちらでは初発酵素である Homocitrate synthase (HCS) がリジンによる制御を受けるため [14]、AK が 1 つのみでもバランスよく生産量が制御されると考えられる。さらに、*C. glutamicum* でも AK は 1 つしか見られないが、この AK はリジンとスレオニンが共に存在するときには阻害がかからない特徴的な協奏阻害機構によって活性が制御される[26]。*A. thaliana* の AKI ではリジンによる阻害が *S*-Adenosylmethionine (SAM) の添加によって相乗的に強くなることが知られているが[47]、*C. glutamicum* 由来の AK のようにリジンとスレオニンの共存下でのみ阻害がかかるという例は *B. subtilis* の AKIII[48]以外では見られない。

これまでに解析されてきた AK は全てオリゴマー構造をとっており、そのサブユニット構成にも多様性が見られる。*E. coli* の AKIII[38]に代表されるように、ホモオリゴマー構造 ( $\alpha_2$  または  $\alpha_4$  型) をとる AK と *C. glutamicum* の AK のように、それぞれ 2 つの  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットからなる  $\alpha_2\beta_2$  型ヘテロテトラマー構造に分けられる。この  $\alpha_2\beta_2$  型 AK は in-frame overlapping gene (Fig. 1-7) という特徴的な遺伝子によってコードされており、 $\alpha$  サブユニット

の mRNA の途中に翻訳開始点が存在し、 $\alpha$ サブユニットの C 末側と同一アミノ酸配列を持つ  $\beta$ サブユニットが翻訳される。この  $\alpha_2\beta_2$  型 AK は *C. glutamicum*[49, 50]や *T. thermophilus*[46]、*B. subtilis* の AKII[51]にみられる。AK は 2 つのドメインから構成され、 $\alpha$ サブユニットの N 末側の AAK ドメインが触媒ドメインで、 $\alpha$ サブユニットの C 末側及びそれと同じアミノ酸配列を持つ  $\beta$ サブユニットが活性制御ドメインであることが分かっている[52]。この活性制御ドメインには ACT (Aspartate kinase, Chorismate mutase, TyrA)ドメインと呼ばれる、アロステリックな活性制御を受ける酵素のエフェクター結合を担うドメイン[53, 54]が 2 つ並んで存在している。この ACT ドメインは ACT ドメイン同士が相互作用することでエフェクター結合部位を形成することが知られており[55]、その相互作用様式には多様性が見られる[56]。また、最近活性制御ドメインに ACT ドメインを 4 つ持つ AK がシアノバクテリアで見出され、ホモオリゴマーでありながら、 $\alpha_2\beta_2$  様の四次構造を示すことが明らかとなっている[57]。

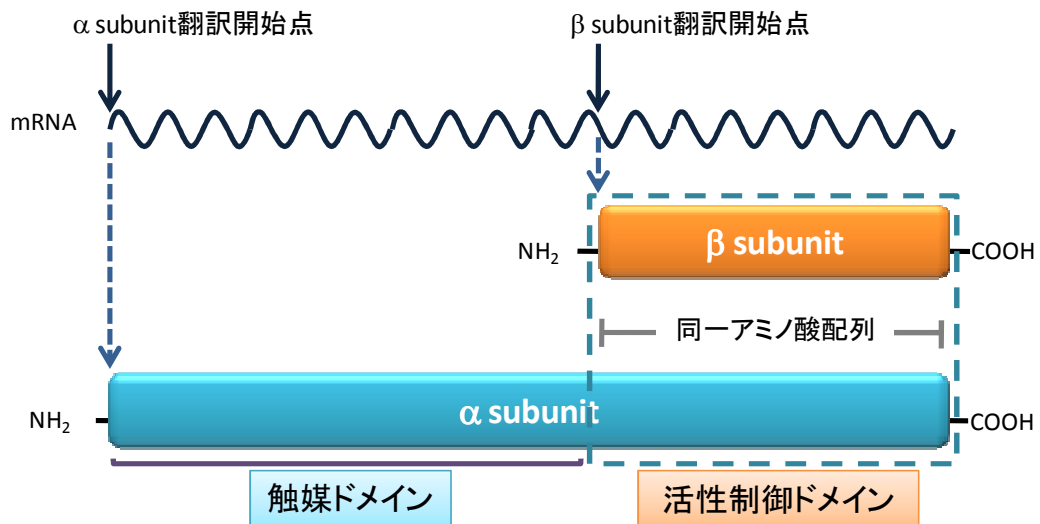


Figure 1-7 in-frame overlapping gene

Table 1-1 AK の種類と阻害剤

	アインザイム	四次構造	阻害剤	PDB ID
<i>E. coli</i>	AKI-HSDHI	$\alpha_2$ or $\alpha_4$	Thr	
	AKII-HSDHII	$\alpha_2$	repressed by Met	
	AKIII	$\alpha_2$ or $\alpha_4$	Lys	2j0w, 2j0x
<i>B. subtilis</i>	AKI	$\alpha_x$	DAP	
	AKII	$\alpha_2\beta_2$	Lys	
	AKIII	$\alpha_2$	Lys, Thr (協奏阻害)	
<i>C. glutamicum</i>	AK	$\alpha_2\beta_2$	Lys, Thr (協奏阻害)	2tdj, 3aaw, 3ab2, 3ab4
<i>T. thermophilus</i>	AK	$\alpha_2\beta_2$	Thr	2td9
<i>A. thaliana</i>	AKI	$\alpha_2$	Lys, SAM	2cdq
<i>M. jannaschii</i>	AK	$\alpha_2$	Thr	2hmf, 3c1m, 3c1n, 3c20
<i>Synechocystis</i>	AK	$\alpha_2$ (like $\alpha_2\beta_2$ )	Lys, Thr	3l76

#### 1-4-2 N-アセチルグルタミン酸キナーゼ

N-アセチルグルタミン酸キナーゼ (NAGK、ArgB) は、アルギニン生合成経路の二番目の反応を触媒する酵素であり、N-アセチルグルタミン酸の側鎖カルボキシル基を ATP を用いてリン酸化する酵素である。アルギニン生合成の初発物質であるグルタミン酸のアセチル化には 2 種類存在し、N-Acetylglutamate synthase (NAGS) によるアセチル化と Ornithine acetyltransferase (OAT) によるアセチルオルニチンからオルニチンへの脱アセチル化と共役して起こるアセチル化がある。前者の経路を利用する *E. coli* などでは NAGS が最終産物のアルギニンによるフィードバック阻害を受け、後者の場合は NAGK が制御を受ける。アルギニン感受性、非感受性の NAGK の結晶構造がすでに決定されており[39, 58]、アルギニン非感受性の *E. coli* 由来 NAGK はダイマー構造を、アルギニンにより制御を受ける *Thermotoga maritima* や *Pseudomonas aeruginosa* の NAGK はヘキサマー構造を取る (Fig. 1-8A, B)。 *T. maritima* や *P. aeruginosa* ではアルギニンの結合によって open 構造をとることによって阻害型構造となるといわれており、このような N-lobe、C-lobe 間のエフェクター結合に誘導される open-closed の動きによる活性制御は AAK family の酵素では他にホモオリゴマー型の AK[38, 59] や UMPK で見られている[60]。また、アルギニン感受性の NAGK ヘキサマーは PII と呼ばれる細胞内の窒素や炭素、エネルギー状態に応じて様々な代謝酵素や転写因子、輸送タンパク質と関わる小さなタンパク質と相互作用し、アルギニンによる阻害が解除

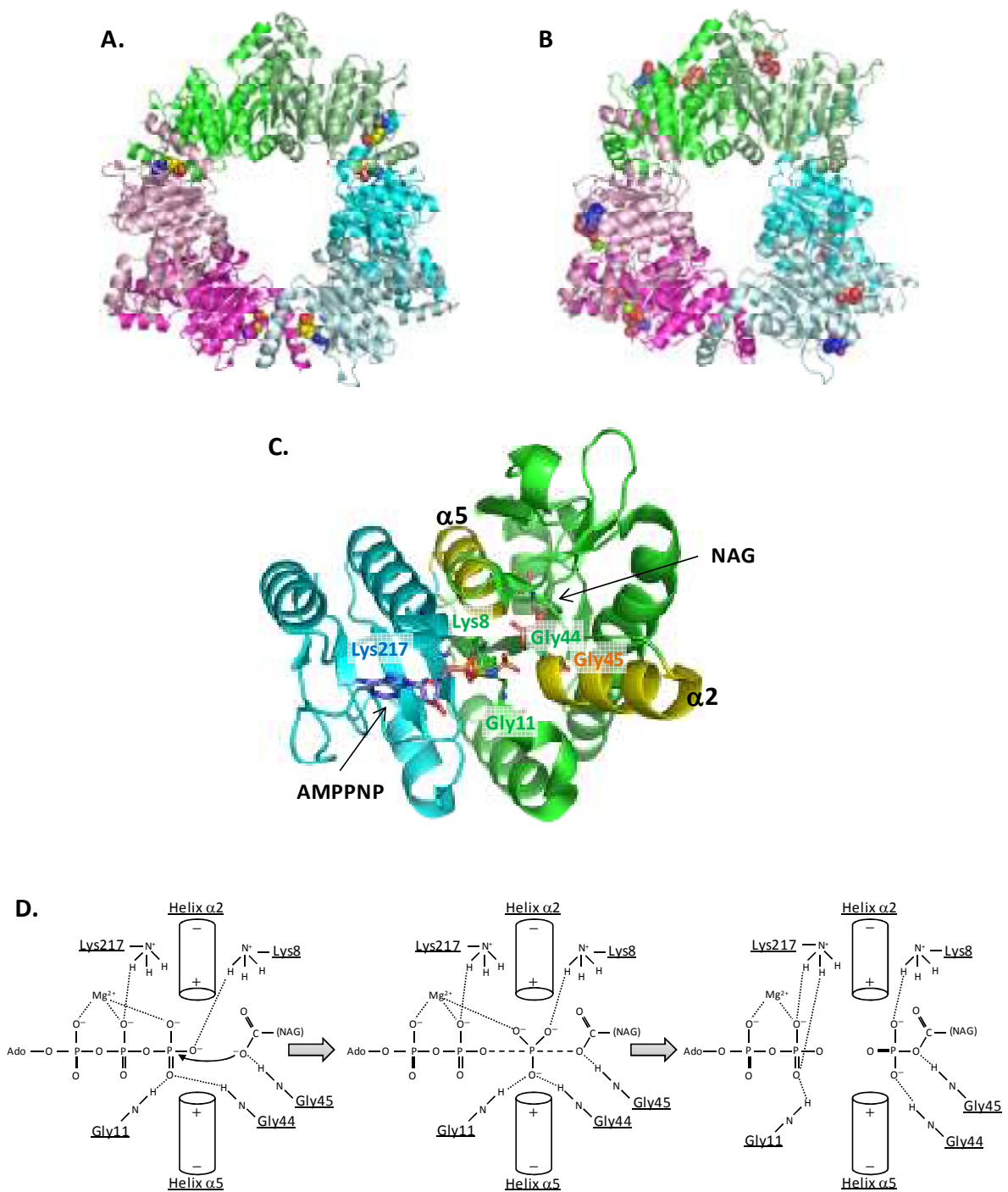


Figure 1-8 NAGK の阻害機構及び触媒機構

- Arg 結合型(阻害型)の *T. maritima* 由来 NAGK ヘキサマー-open 構造 (Arg は黄色の CPK モデルで示す)
- 活性型の *P. aeruginosa* 由来の NAGK ヘキサマー-closed 構造 (基質の *N*-アセチルグルタミン酸 (NAG) とそのアナログである ADP をそれぞれピンクと青の CPK モデルで示す)
- E. coli* の NAGK における活性中心 (N-lobe の残基は緑で、C-lobe の残基は水色で示す)
- E. coli* の NAGK における触媒機構モデル

されることが知られている[61]。さらに、基質結合型の結晶構造から触媒機構の詳細も明らかになっている[62] (Fig. 1-7C, D)。このNAGK (ArgB)は、前述した *T. thermophilus* のリジン生合成における AAA 以降後半の第二番目の反応を担う LysZ のホモログであり、LysZ は AAA の $\alpha$ -アミノ基が保護された LysW- $\gamma$ -AAA の AAA 側鎖のカルボキシル基のリン酸化反応を触媒すると考えられている。

## 1-5 本研究の目的

これまで述べてきたように、リジン生合成経路には AAA や DAP を中間体とする経路があり、その中でもいくつかの多様性がみられる一方で、お互いに同様の反応を行う酵素で経路が構成されているなど類似性もみられる。またこれらのリジン生合成経路は他の一次代謝経路と相同性を示し、さらに、*T. thermophilus* の新規リジン生合成経路の AAA 以降後半の経路の酵素をコードする遺伝子は超好熱性古細菌にも見られることや、それがアルギニン生合成経路でも共通に利用されている可能性が高いことなどから、リジン生合成経路はアミノ酸生合成経路の進化の過程に関する知見を得るための優れた研究対象であるといえる。また、我が国を代表する産業の一つに挙げられるアミノ酸発酵においてリジンは生産量の最も多いアミノ酸の一つである。リジン発酵生産菌の育種の過程で、その生合成経路には最終産物などによるフィードバック制御や転写制御が存在することや、栄養要求性やアナログ耐性を指標とした変異スクリーニングにより、これらの制御が解除されたリジン高生産変異株が取得されてきた。しかしながら、このようなより効率的なリジン生産を行うための研究は多くなされてきたが、その制御機構の詳細や阻害解除メカニズムについては、その機構解明の重要性は理解されながらも、長い間明らかにされてこなかった。このようにリジン生合成経路は基礎と応用の両面で大変興味深い研究対象であり、その中でもリジン生産菌 *C. glutamicum* の DAP 経路や *T. thermophilus* の AAA 経路において類似の反応を行い、アミノ酸キナーゼファミリーに分類される酵素に着目し、前者ではその制御機構を、後者では基質認識機構や新規キャリアタンパク質の役割について明らかにすることを目的として研究を行った。

## 1-6 本論文の構成

本論文の第二章では、構造生物学を用いてリジン発酵菌である *C. glutamicum* 由来のアスパラギン酸キナーゼのリジン、スレオニンによる協奏阻害機構の解明を目指し、その活性制御ドメイン(サブユニット)の結晶構造解析を行った。その結果スレオニンの結合による活性制御への影響が示された。さらに、第三章では同じく *C. glutamicum* 由来のアスパラギン酸キナーゼの全長での結晶構造解析を行い、スレオニンだけでなくリジンの結合部位やこれら2つの阻害剤による制御機構を解明することに成功した。また、第四章では、*T. thermophilus* 由来のアスパラギン酸キナーゼの熱安定性の向上に寄与するとされる活性制御サブユニット( $\beta$ サブユニット)の結晶構造解析を行い、そのスレオニンによる活性制御メカニズム及び、耐熱化機構についての考察を行った。第五章では、最近明らかとなった *T. thermophilus* の新規リジン生合成経路において AAA 以降の第 2 番目の酵素であり、AK と類似した反応を担うアミノ酸キナーゼである LysZ の機能や、基質である AAA の $\alpha$ -アミノ基が小タンパク質 LysW によって保護された LysW- $\gamma$ -AAA の認識機構を構造生物学的に明らかにし、AAA の $\alpha$ -アミノ基の保護基として働く LysW のリジン生合成を効率的に進めるためのキャリアタンパク質としての役割を明らかにすることを目指した。



## 第二章 *Corynebacterium glutamicum* 由来のアスパラギン酸キナーゼの $\beta$ サブユニットの構造解析

### 2-1 背景と目的

*Corynebacterium glutamicum* は産業上有用な微生物であり、主に L-グルタミン酸や L-リジンなどのアミノ酸の発酵生産に用いられている。*C. glutamicum* においてリジンはアスパラギン酸を初発物質としたアスパラギン酸ファミリーアミノ酸生合成経路で生合成される。この生合成経路の初発酵素であるアスパラギン酸キナーゼ(AK)は最終産物によってフィードバック阻害を受けることが知られているが、現在工業的に利用されている *C. glutamicum* はこのフィードバック阻害耐性変異株である。しかし、AK はリジン生合成経路の鍵酵素でありながら、このフィードバック阻害機構は 50 年以上もの間解明されてこなかった。*C. glutamicum* の AK (CgAK) は経路の最終産物であるリジンとスレオニンが共に高濃度で存在するときのみに阻害を受ける、協奏阻害という特徴的な阻害様式を持つ[26]。また、CgAK は in-frame overlapping gene と呼ばれる特徴的な遺伝子にコードされる $\alpha_2\beta_2$ ヘテロテトラマー型構造をとることが分かっており[49]、そのサブユニット構成にも興味を持たれる。

さらに *C. glutamicum* は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の近縁種であり、CgAK と *M. tuberculosis* 由来の AK は高い相同性(72%)を示し、CgAK と同様の $\alpha_2\beta_2$ 構造をとるといわれている[63]。さらに、ヒトはリジンを生合成できず、AK を持たないことから、また、DAP が細胞壁の成分であることから、CgAK の活性制御機構や触媒機構を明らかにすることが、抗結核剤をはじめとした医薬品開発の基盤となると考えられる。


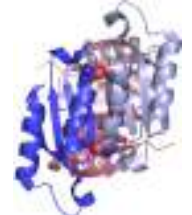

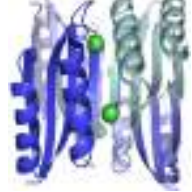



このように協奏阻害や in-frame overlapping gene などの酵素の性質として珍しい特徴をもち、リジン発酵の鍵酵素である CgAK の制御機構を解明することは、基礎的にも応用的にも重要な知見を与えると考えられる。そこで、本章では CgAK の活性制御機構解明を目指した、主に構造生物学を用いた研究について述べる。

#### 2-1-1 ACTドメイン

AK は N 末側に触媒ドメイン、C 末側に活性制御ドメインを持ち、CgAK のような $\alpha_2\beta_2$ 型の AK では $\alpha$ サブユニットの C 末側と $\beta$ サブユニットが同一アミノ酸配列を持つため、 $\beta$ サブユニットも活性制御サブユニットとして機能するとされている[52]。この活性制御ドメイン(サブユニ

ット)には ACTドメインと呼ばれる、アミノ酸生合成酵素をはじめとしたアロステリックな制御を受ける酵素に広く分布するエフェクター結合を担うとされるドメインが 2 つ存在する。この ACTドメインは Aspartate kinase, Chorismate mutase, TyrA (Prephenate dehydrogenase)の頭文字をとって名付けられ、 $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ という特徴的な fold を持ち、複数の単位が相互作用してエフェクター結合部位を形成するとされている。ACT ドメインは主にアミノ酸やプリンが生合成に関与する酵素に含まれているが、アミノ酸代謝に関する転写制御因子(これらは RAM (Regulator of amino acid metabolism)ドメインと呼ばれる)[64]や NikR という細胞内の  $\text{Ni}^{2+}$  濃度調節に関わる転写因子[65]、thiamine 輸送に関わる YkoF[66]など、広く分布している。現在、Pfam データベース上には 1 万を超える配列が ACTドメインを持つとして登録されており、その立体構造も決定されつつある。立体構造解析から、ACT ドメインの相互作用様式やエフェクターの結合様式には Grant [56]によってまとめられているように多様性があることが知られている (Table 2-1)。基本とされる ACTドメインの相互作用は *E. coli* 由来の 3PGDH に代表される 2 つの ACTドメインが隣同士に並び、dimer interface に 2 か所のエフェクター結合ドメインを形成するというものである (Fig. 2-1)。AK ではモノマーあたり 2 つの ACTドメインを持つが、すでに決定されているホモオリゴマー型の AK の結晶構造から、N 末側の ACT1 は  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ と連続しているのに対し、C 末側の ACT2 は ACT1 の後の  $\beta\alpha\beta\alpha$ と ACT1 の前に存在する  $\beta$  strand で ACTドメインを形成するという特徴を持っていることが明らかとなっている[38, 59, 67]。ACTドメインは主にアミノ酸を結合してその代謝調節を行うものが多いながら、その構成や配置などに多様性が見られる。また、ACT ドメインを含むタンパク質として同定されているものは古細菌やバクテリア由来のものからラット由来のものまで広くに分布しており、「進化的に可動性のある保存された単位 (conserved, evolutionarily mobile module)」と言われている。このような進化的に保存され、広く分布した ACT ドメインをもつ AK の制御機構を解析することで、様々な代謝経路における普遍的な酵素の活性調節機構の解明につながるものと考えられる。

Table 2-1 ACTドメイン同士の相互作用の多様性

Protein	PDB ID	Structure	相互作用するACTドメインの数	$\beta$ sheetの相互作用様式
3PGDH	1PSD		2	side-by-side
ホモオリゴマー型 AK	2CDQ		4	side-by-side (等価) face-to-face (非等価)
ATPPRT	1NH8		3	face-to-face
NikR	1Q5Y		4	side-by-side (等価) face-to-face (等価)
IlvH	2F1F		4	side-by-side (等価) tandem (等価) face-to-face (非等価)
TD	1TDJ		4	side-by-side (非等価) face-to-face (等価)
PheOH	1PHZ		1	none

3PGDH; *E. coli* 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, AK; *A. thaliana* Aspartate kinase, ATPPRT; *M. tuberculosis* ATP phosphoribosyltransferase, NikR; *E. coli* NikR transcription regulator, IlvH; *E. coli* regulatory domain of Acetohydroxyacid synthase, TD; *E. coli* Threonine deaminase, PheOH; rat Phenylalanine hydroxylase



Figure 2-1 隣り合ったACTドメインによるエフェクター結合ユニットとエフェクター結合部位

### 2-1-3 キメラ AK の解析

これまで当研究室にて CgAK をはじめとして、*T. thermophilus* 由来の AK (TtAK) や *B. subtilis* 由来の AKII (BsAKII) といった  $\alpha_2\beta_2$  型の AK に着目して研究を行ってきた。CgAK はリジンとスレオニンの協奏阻害を受け、一方で TtAK はスレオニンによって、BsAKII はリジンによって阻害を受ける。 $\alpha$ サブユニットの N 末側の触媒ドメインと、C 末側の活性制御ドメイン及び  $\beta$ サブユニットをそれぞれ異なる AK 由来のものとしたキメラ AK の解析が進められ、触媒ドメインを BsAKII 由来、活性制御ドメイン(サブユニット)を TtAK 由来にしたキメラ AK では本来リジンによって制御を受ける BsAKII が TtAK の阻害剤であるスレオニンによって制御を受けるように機能が変換された[52]。また、触媒ドメインを BsAKII 由来、活性制御ドメインをリジン・スレオニンによる協奏阻害を受ける CgAK 由来としたキメラ AK である BCC では興味深い阻害プロファイルを示した (Fig. 2-2A)。CgAK ではリジンやスレオニンのみでは阻害がかからないが、BCC ではスレオニンのみで阻害がかかり、さらにリジンの添加によってその阻害が解除された。このことから、CgAK ではリジンまたはスレオニン耐性となる変異体は全て阻害がかからなくなってしまうので、両者の区別ができなかったが、BCC ではスレオニン耐性であれば全く阻害がかからなくなり、リジン耐性ではリジン・スレオニンの共存した条件とスレオニンのみの条件で同じ阻害プロファイルを示すことになるため、2 つの区別ができるようになり、変異体解析からリジンやスレオニンの結合に重要なアミノ酸を特定することが可能となった (Fig. 2-2B-E)。しかしながら、BCC における変異体の解析からリジンやスレオニン結合に関わるアミノ酸残基の大まかな傾向はつかめたものの、活性制御機構の解明には至っていなかった。阻害剤結合部位をはじめとした、リジン・スレオニンによる協奏阻害機構の解析を分子レベルで解明することを目指し、X 線結晶構造解析を行った。

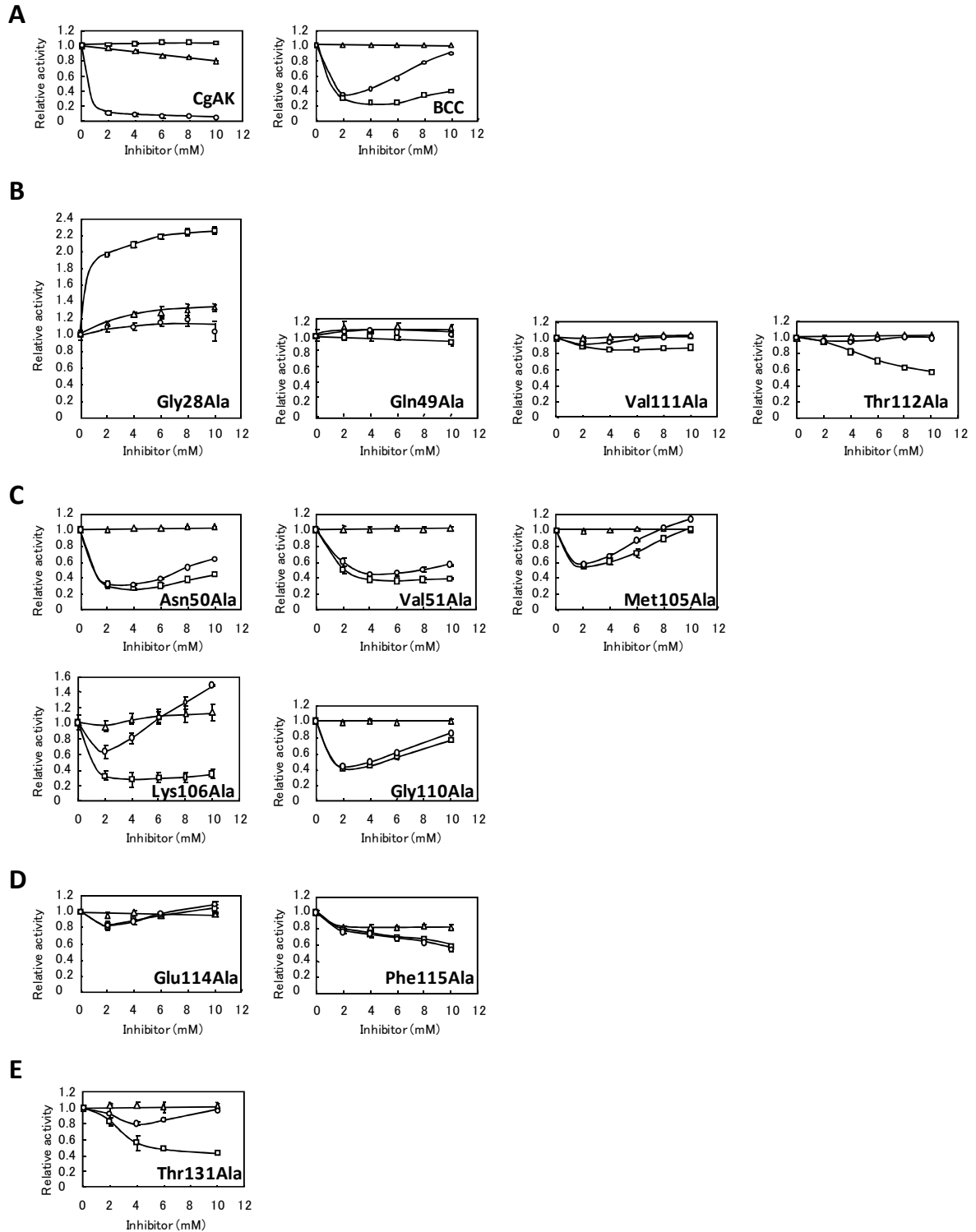


Figure 2-2 キメラ AK BCC の阻害プロファイル

- A. 野生型 CgAK とキメラ AK BCC の阻害プロファイル
  - B. Thr に対する感受性に变化が生じた変異体のプロファイル
  - C. Lys に対する感受性に变化が生じた変異体のプロファイル
  - D. Thr と Lys 両方に対する感受性に变化が生じた変異体のプロファイル
  - E. Lys や Thr の結合に影響の見られなかった変異体のプロファイル
- ; Thr, △; Lys, ○; Thr と Lys の添加条件

## 2-2 方法

### 2-2-1 菌株及び試薬類

遺伝子操作では *E. coli* DH5 $\alpha$  [ $F^-$   $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*( $r_K^- m_K^+$ ) *phoA supE44 \lambda thi-1 gyrA96 relA1*]を宿主として用い、培養は LB 培地にて行った。各操作は Molecular Cloning[68]に従って行った。また、Ampicilin、Kanamycin、Chloramphenicol は必要に応じてそれぞれ 200  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ g/ml、30  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。

タンパク質の大量発現では Jean-Claude Patte 博士 (Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, France) に分譲していただいた *E. coli* GT3 株 [*thrA1016 metL1005 lysC1004*] 及び BL21-CodonPlus(DE3)-RIL [ $F^-$  *ompT hsdS*( $r_B^- m_B^-$ ) *dcm^+ Tet^r gal \lambda(DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam^r*]] (Stratagene) を宿主として用いた。また、培地にはそれぞれの対応する抗生物質や Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した。*

遺伝子操作に用いた酵素類はタカラバイオや東洋紡、Bio-Rad、結晶化試薬は Hampton Research、その他の試薬類は和光純薬、Sigma-Aldrich、関東化学、ナカライテスクから購入したものを使用した。また、遺伝子操作に用いたオリゴヌクレオチドはオペロンバイオテクノロジー及び Sigma から購入した。

### 2-2-2 発現プラスミドの構築

結晶化のためのタンパク質発現に用いるため、CgAK の $\beta$ サブユニット(CgAK $\beta$ )のみの遺伝子断片を pET26b(+)(Novagen) のマルチプルクローニングサイト(MCS)に挿入した発現プラスミドを構築した。

遺伝子断片はそれぞれ、当研究室においてサブクローニングされていたプラスミドを鋳型に以下に示す C 末端に(His)<sub>6</sub> タグをコードする配列を付加したオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行った。

5'-CGGGATCCCATATGGAAGAAGCAGTCTT-3'

5'-CCCGAATTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGTCCGGTGC CTGCATA-3'

増幅した断片を制限酵素 (*Bam*HI/*Eco*RI) で処理し、pBluescript II SK (+)(Stratagene) の MCS に連結した (pBS-CgAK $\beta$ )。得られたクローンに対して DNA sequencer DSL-2000 (Shimadzu) を用いて塩基配列の確認を行い、pET26b(+)*の* MCS の *Nde*I、*Eco*RI サイトに導

入し、この発現プラスミドを pET-CgAK $\beta$ とした。

分子量測定に供した CgAK $\beta$ の部位特異的変異体の発現プラスミドは、pBS-CgAK $\beta$ を鋳型として Quik-Change site-directed mutagenesis kits (Stratagene)を用いて変異を導入、配列の確認を行い、pET-26b(+)に連結させた。

キメラ AK BCC や CgAK 全長の部位特異的変異体の発現プラスミドは、それぞれ当研究室において作製された、pUC18 に BsAKII の触媒ドメインと CgAK の活性制御ドメインが連続して組み込まれた pBChis や同じく pUC18 に CgAK の $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子が導入された pCChis というプラスミドを鋳型として、CgAK $\beta$ の変異体と同様に作製した。これら部位特異的変異の導入に用いたプライマーの配列は Table 2-2 に示す。

Table 2-2 部位特異的変異の導入に用いたプライマー

変異体	塩基配列
<b>Ala30Val</b>	5' -GATAAGCCAGGCGAGGTTGCCAAGGTTTTTC-3'
	5' -GAAAACCTTGGCAACCTCGCCTGGCTTATC-3'
<b>Gln49Ala</b>	5' -ATTGACATGGTTCTGGCGAACGTCTCTTCT-3'
	5' -AGAAGAGACGTTCCGCCAGAACCATGTCAAT-3'
<b>Ser52Phe</b>	5' -GTTCTGCAGAACGTCTTCTCTGTAGAAGAC-3'
	5' -CTGTTCTACAGAGAAGACGTTCTGCAGAAC-3'
<b>Thr59Ile</b>	5' -GTGGAAGACGGCACCATCGACATCACGTTC-3'
	5' -GTGGAAGACGGCACCATCGACATCACGTTC-3'
<b>Gly110Ala</b>	5' -ATGAAGTCTCACCCAGCCGTTACCGCAGAG-3'
	5' -CTCTGCGGTAACGGCTGGGTGAGACTTCAT-3'
<b>Val111Ala</b>	5' -TCTCACCCAGGTGCCACCGCAGAGTTCATG-3'
	5' -CATGAACTCTGCGGTGGCACCTGGGTGAGA-3'
<b>Thr112Ala</b>	5' -CACCCAGGTGTTGCCGCAGAGTTCATGGAA-3'
	5' -TTCCATGAACTCTGCGGCAACACCTGGGTG-3'
<b>Glu114Ala</b>	5' -GGTGTACCAGCAGCCTTCATGGAAGCTCTG-3'
	5' -CAGAGCTTCCATGAAGGCTGCGGTAACACC-3'
<b>Phe115Ala</b>	5' -GTTACCGCAGAGGCCATGGAAGCTCTGCGC-3'
	5' -GCGCAGAGCTTCCATGGCCTCTGCGGTACC-3'
<b>Thr131Ala</b>	5' -GAATTGATTTCCGCCCTCTGAGATCCGCATT-3'
	5' -AATGCGGATCTCAGAGGCCGAAATCAATTC-3'

### 2-2-3 CgAK $\beta$ の発現、精製及び結晶化

(His)<sub>6</sub> タグが融合した CgAK $\beta$ は *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を宿主として大量発現した。pET-CgAK $\beta$ によって形質転換した BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を Kanamycin と Chloramphenicolを含む 2×YT 培地で 37 °C にて 6 時間程度前培養し、この培養液を 200 ml の上記培地の入った坂口フラスコに 1 % 植菌し、再び 37 °C で振盪培養を行った。600 nm での菌体濁度 (OD<sub>600</sub>) が約 0.6 程度になった時点で、IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、引き続き 30 °C にて約 12-14 時間振盪培養した。菌体を遠心により回収し、Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5) で洗浄後、Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 500 mM Ammonium sulfate) で再度懸濁した。菌体を超音波破碎したのち、40,000 × g で遠心を行い、その上清を粗抽出液とした。この粗抽出液をあらかじめ 20 mM Imidazole pH 7.5 を含んだ Buffer B で平衡化した His・Bind Resin, Ni-charged (Novagen) カラムにアプライし、Imidazole 濃度を段階的に上昇されて Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。目的タンパク質を含む画分を VIVASPIN (Sartorius) を用いて 2 ml まで濃縮し、これを Buffer B であらかじめ平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare) を素通りさせて精製サンプルとした。組換えタンパク質の精製度は 15 % の Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって確認した。また、タンパク質濃度は Protein assay kit (Bio-Rad) を用いた Bradford 法[69]にて測定した。

精製サンプルは VIVASPIN で濃縮し、結晶化には 10 mg/ml の濃度で用いた。結晶化スクリーニングでは 10 mM Thr (以後アミノ酸は全て L 体とし、Thr のような三文字表記で表す) や 10 mM Lys、及びその両方を添加したサンプルも用意し、Hanging drop 蒸気拡散法によって Hampton Reserach のスクリーニングキットを用いて行った。結晶が得られた条件に対して条件の最適化を行い、36 % (w/v) Polyethylen glycol (PEG) 4000、0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.0、0.2 M Ammonium sulfate の条件で結晶が得られた。

### 2-2-4 CgAK $\beta$ の構造決定

データ収集は茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 内の Photon Factory のビームライン NW12 にて行った。結晶はデータ収集の前に、クライオプロテクトANTとして 25 % (w/v) PEG400 を含むリザーバー溶液中に移し、100 K におけるクライオ条件で X 線を照射した。X 線の波長は 1 Å で、回折反射イメージはビームラインに設置されている CCD カメラを用いて収集した。回折データはプログラム HKL2000[70]を用いて処理した。



CgAK $\beta$ の結晶は空間群 C2 に属し、その格子定数は  $a = 80.0 \text{ \AA}$ 、 $b = 59.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 75.8 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 116.2^\circ$ であった。CgAK $\beta$ の位相決定は、第四章で示す CgAK $\beta$ と約 40 %のアミノ酸配列相同性を持つ TtAK $\beta$ の構造をサーチモデルとした分子置換法によって行った。分子置換は CCP4[71]の MOLREP[72]を用いて行った。電子密度図を用いたモデルの修正には XtalView[73]を、構造精密化には CNS1.1[74]を使用した。タンパク質構造の妥当性は PROCHECK[75]で確認し、論文中の図は XtalView の XFIT、Raster3D[76]、PyMOL[77]を用いて作製した。

#### 2-2-5 分子量測定

野生型や変異型の CgAK $\beta$ のサブユニット構成はゲルろ過クロマトグラフィー及び超遠心によって解析した。分子量測定のための野生型及び変異型の CgAK $\beta$ の発現と精製は基本的に結晶化用サンプルと同様に行ったが、超音波破碎以降の段階での buffer は Buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl)を用いた。ゲルろ過ではカラム(HiLoad 26/60 Superdex 75)をあらかじめ Buffer C またはこれに 5 mM Thr、5 mM Lys およびその両方を加えた buffer で平衡化し、5 mg に調製したサンプルをこれらの buffer で流速 2.5 ml/min で溶出させた。このとき、標準タンパク質として BSA (67 kDa)、Ovalbumin (43 kDa)、Chymotrypsinogen (25 kDa)、RNaseA (13 kDa)を用いた。

沈降速度法による分子量測定には超遠心機 Optima XL-A (Beckman Coulter)を用いた。測定は 20 °C で行い、280 nm の吸光が 0.8 となるように調整したサンプルを double-sector セルに 400  $\mu$ l 入れ、An50Ti rotor (Beckman Coulter) で 40,000 rpm で回転させた。全てのデータは波長 280 nm で記録し、吸収帯の位置変化はプログラム SEDFIT[78]で解析した。

#### 2-2-6 キメラ AK BCC の発現と精製

BCC とその変異酵素の発現宿主には *E. coli* の AK 欠損株である GT3 を用いた。形質転換された GT3 を、Ampicillin を含んだ 2 $\times$ YT 培地で培養し、その前培養液を同様の培地を 200 ml 含む坂口フラスコに 1 %植菌した。OD<sub>600</sub> が約 0.6 となるまで 37 °C で振盪培養し、IPTG を終濃度 1 mM で添加し引き続き 37 °C で 12-14 時間振盪培養を行った。集菌、その後の精製は CgAK $\beta$ の精製と同様の過程で行ったが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製は行わなかった。

### 2-2-7 AK の活性測定

AK の活性は基本的には Black と Wright[79]の方法に従って測定した。反応溶液は 200 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM MgSO<sub>4</sub>、500 mM Ammonium sulfate、160 mM Potassium hydroxide、160 mM NH<sub>2</sub>OH-HCl (ヒドロキシルアミン塩酸塩)、10 mM ATP、10 mM Aspartate という組成で調製した。さらに、Lys、Thr またその両方をそれぞれ 0 mM から 10 mM になるように添加した。これら反応溶液 240  $\mu$ l にタンパク質濃度を 1 mg/ml に調製した精製サンプルを 10  $\mu$ l 加え (終濃度 40  $\mu$ g/ml)、30 °C で適当時間反応させた後、750  $\mu$ l の 5% (w/v) FeCl<sub>3</sub> を添加することで反応を停止させた。サンプルを 65 °C で 10 分間インキュベートし発色させ、室温に戻してから、540 nm の吸光度を測定した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 CgAK $\beta$ の結晶構造

CgAK $\beta$ を 10 mM Lys、10 mM Thr 存在下で結晶化することに成功し (Fig. 2-3A)、1.58 Å 分解能で回折データを取得した。TtAK $\beta$ の構造 (第四章参照) をモデルとした分子置換法によって構造決定を行ったところ、結晶学的非対称単位には 1 分子の CgAK $\beta$ のダイマーと 2 分子の Thr、結晶化バッファー由来の 1 分子のクエン酸、そして 275 分子の水分子が含まれていた。CgAK の阻害剤の一つである Lys は結晶化条件に加えたにもかかわらず、Lys に相当する電子密度は観察されなかった。N 末端の一部 (chain A の 1-3 および chain B の 1) と C 末端の一部 (chain A の 168-172 及び chain B の 159-162 と 169-172) の電子密度は観察せず、disorder しているようだった。PROCHECK による Ramachandran plot では 92.8 % の残基が Most favored regions に、7.2 % の残基が Additionally favored regions に分類された。X 線回折データと精密化の統計値を Table 2-3 に示した。

CgAK $\beta$ の結晶構造はホモダイマーであったが (Fig. 2-3B)、これは $\alpha_2\beta_2$ 型である CgAK の  $\alpha$ サブユニット内の活性制御ドメインと $\beta$ サブユニットから構成される活性制御ドメインダイマーの構造に相当する。ダイマーのうちどちらのサブユニットも 2 つの $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ という特徴的な ACTドメインモチーフを持っていた。モノマー同士の root mean square deviation (RMSD) は 0.81 Å であり、特に構造の異なる部分は 53-57、68-85 そして 130-136 であった (Fig. 2-3C)。

モノマー中の 2 つの ACTドメイン (N 末側を ACT1、C 末側を ACT2 と呼ぶ) はどちらも同じ 4 つの  $\beta$  strand からなる逆平行  $\beta$  sheet と 2 つの  $\alpha$  helix という topology をもっている。しかし、ACT1 は連続したポリペプチド鎖によって  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  fold が形成されているが、ACT2 は最後の  $\beta$  strand が ACT1 の前に存在し、連続しないペプチド鎖によって ACTドメインが構成されていた (Fig. 2-3D)。1 つのサブユニットの ACT1 と ACT2 はその  $\beta$  sheet が互いに垂直となる位置関係に存在し、一方のサブユニットの ACT1 ともう一方のサブユニットの ACT2 が隣り合うように相互作用して、エフェクター結合ユニットを形成している。つまり、異なるサブユニットの ACT1 と ACT2 が隣り合い、その 8 つの  $\beta$  strand からなる  $\beta$  sheet が垂直に向かい合うようにダイマーを形成していた。

ACTドメインを持つタンパク質で最初に結晶構造が報告された *E. coli* 由来の 3PGDH では 2 つの ACTドメインが隣り合ってその dimer interface に site 1、site 2 といった 2 か所のエフェクター結合部位を形成することが言われている。CgAK $\beta$ の構造では Thr はその 2 か所

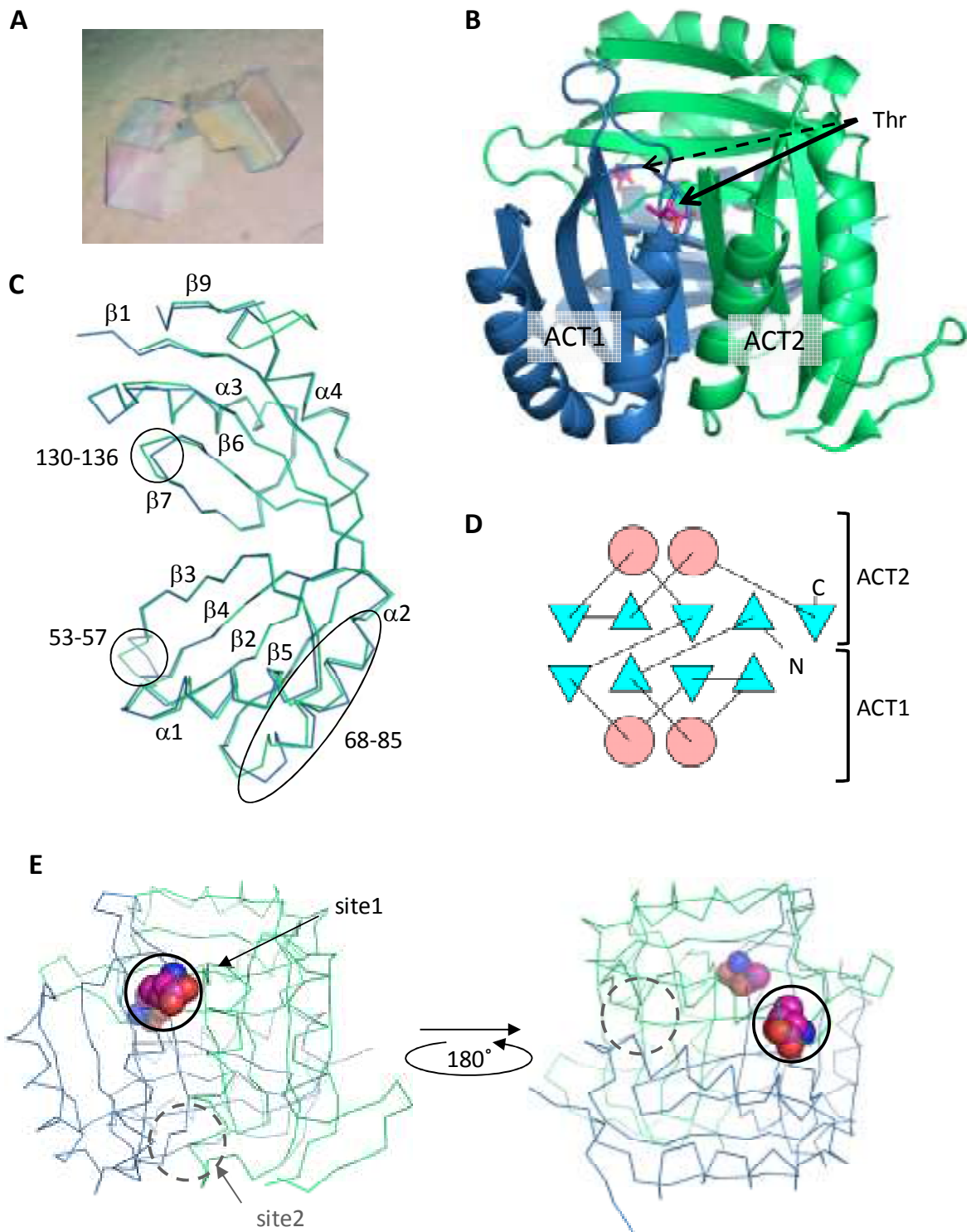


Figure 2-3 CgAK $\beta$ の全体構造

A. CgAK $\beta$ の結晶

B. CgAK $\beta$ の全体構造 (chain A と B はそれぞれ緑と青で示した。Thr はマゼンタの CPK モデルで示した。)

C. chainA と chain B の重ね合わせ

D. CgAK $\beta$ の topology E. エフェクター結合ユニット

のエフェクター結合部位のうち site 1 に 1 分子ずつ、ダイマーあたり 2 分子結合しており、2 つのサブユニットの間に埋まるように結合 (Fig. 2-3E) し、表面には露出していなかった。

なお、この CgAK $\beta$  の構造は Protein Data Bank に PDB ID: 2DTJ として登録した。

Table 2-3 X 線回折データ収集及び精密化統計値

Data collection <sup>a</sup>	
X-ray source	PF-NW12
Space group	C2
Cell dimensions	$a = 79.0 \text{ \AA}, b = 59.0 \text{ \AA}, c = 75.8 \text{ \AA}, \beta = 116.2^\circ$
Wavelength ( $\text{\AA}$ )	1.000
Resolution ( $\text{\AA}$ )	1.58 (1.64-1.58)
Reflections (total/unique)	151524/43305
$R_{\text{sym}}^b$ (%)	6.4 (48.0)
$I/\sigma(I)$	24.5 (3.5)
Completeness (%)	99.2 (97.1)
Refinement	
Resolution ( $\text{\AA}$ )	37.9-1.58
R-factor <sup>c</sup> (work/test)	19.5/23.2
Number of atoms	2775
Protein	2471
Threonine	16
Citrate	11
Water	277
Average B-factor ( $\text{\AA}^2$ )	
Protein	18.0
Threonine	11.7
Water	31.3
RMS deviations of	
Bond length ( $\text{\AA}$ )	0.027
Bond angle ( $^\circ$ )	2.2
Ramachandran plot <sup>d</sup>	
Most favored (%)	92.8
Additionally favored (%)	7.2

<sup>a</sup> Values in parentheses are data for the highest resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ .

<sup>c</sup> R-factor =  $\sum_{\text{hkl}} ||F_o| - |F_c|| / \sum_{\text{hkl}} |F_o|$ .

<sup>d</sup> Calculated using PROCHECK

### 2-3-2 Thr 結合サイト

Thrの電子密度は、異なるサブユニット由来のACT1とACT2の間に観察された (Fig. 2-4A, B)。Thr のヒドロキシル基は Gln49-N<sup>e</sup>と水素結合を形成しており、メチル基は Ile23、Thr59、Ile61 の側鎖との疎水相互作用によって安定化されていた。また、Thr のアミノ基は Ile126-O や Asp25-O<sup>δ2</sup>によって認識されていた。Thr のカルボキシル基の 2 つの酸素原子のそばには 2 つの水分子が観察され、この水分子は Thr のカルボキシル基、Ala30-N、Ala31-N、Gly28-Nそして Val124-O との間の水素結合ネットワークに関与しており、負電荷を持つカルボキシル基は正電荷を持ったアミノ酸側鎖によって認識されているのではなく主鎖の原子によって安定化されている。Thr のカルボキシル基は helix α1 の N 末端に近く、helix dipole の正電荷が負電荷をもつカルボキシル基を認識していると考えられる。helix α1 の N 末には Pro27 や Gly28 という嵩の小さいアミノ酸が存在し、Pro27 によって決定されているその先の loop の方向が Thr のカルボキシル基が入る空間を邪魔しないことや、この空間に Asp や Glu などの負電荷側鎖を持つアミノ酸残基が存在しないことが、Thr のカルボキシル基の helix dipole による安定化に寄与していると考えられる。さらに、Thr は分子表面に露出しておらず、2つのサブユニット間に埋まるように存在していることから、サブユニット間相互作用に重要な役割を持っていると考えられた。

### 2-3-3 Thr の結合による CgAKβのオリゴマー状態の変化

Thr がサブユニット間に存在し、βサブユニットのダイマー構造の安定化に関与している可能性が考えられたので、CgAKβの Lys や Thr の存在、非存在下でのオリゴマー状態をゲルろ過クロマトグラフィーと超遠心分析によって解析した。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定の結果、何も添加しない場合では理論計算値である 19.4 kDa よりも少し大きい 23.0 kDa に相当する溶出体積でピークが観察された。また、5 mM Thr のみ、5 mM Thr と 5 mM Lys の添加条件ではそれぞれ CgAKβの分子量は 33.8 kDa、33.3 kDa と見積もられ、分子間相互作用が変化していることが明らかとなった。一方で、5 mM Lys のみの添加条件では何も添加しない場合と変わらなかった (23.3 kDa)。このことから Thr の非存在下では CgAKβはモノマーとして存在するが、Thr が結合することでダイマーとなると考えられた。さらに、CgAKβにおけるサブユニット構成の変化をより明確にするために、沈降速度法による超遠心分析を行った結果、Thr 非存在条件では 20.2 kDa、Thr 存在下では 36.0 kDa と見積もられ、それぞれモノマー、ダイマーの理論値に近い値となった (Table 2-4)。

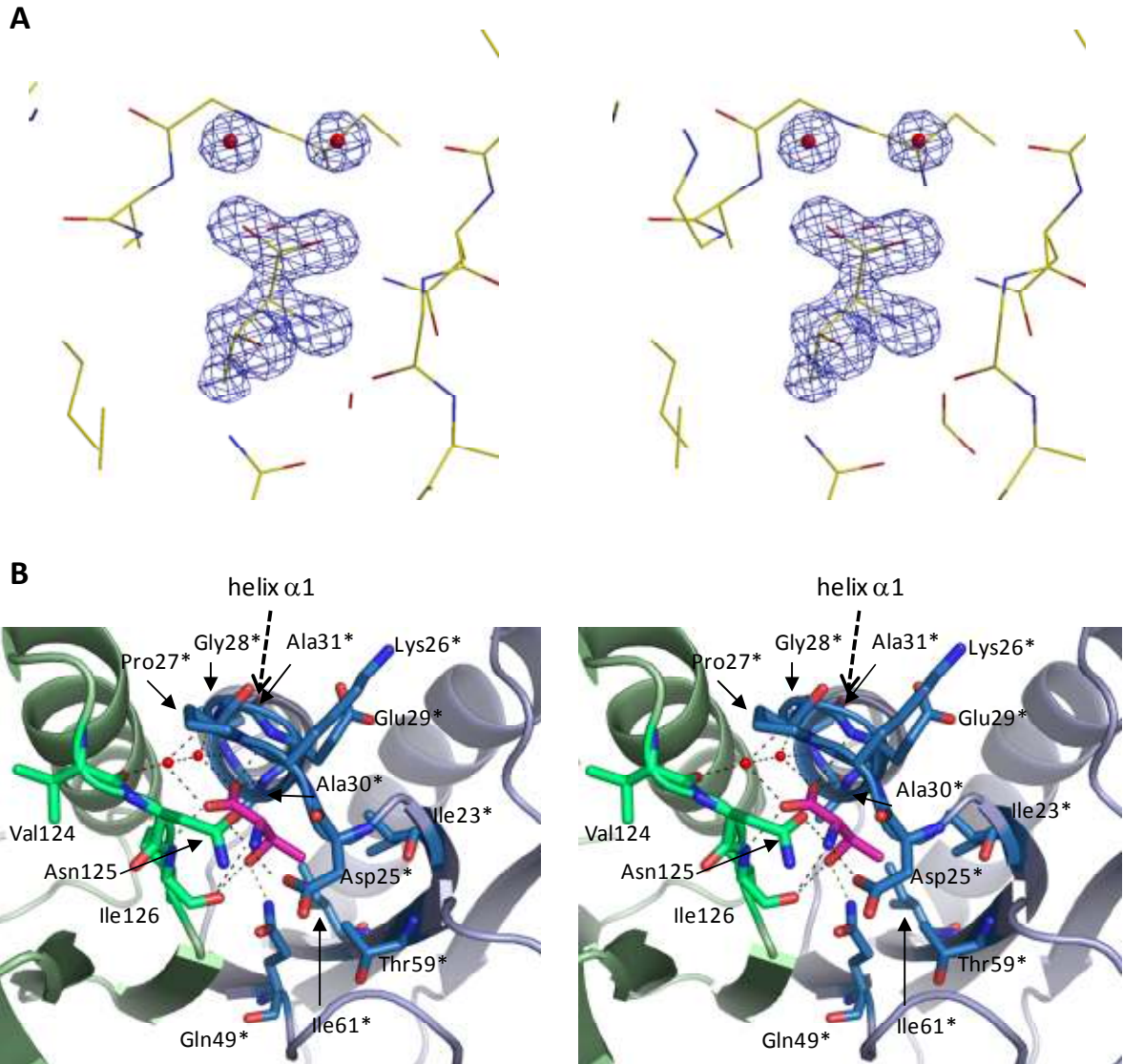


Figure 2-4 Thr 結合サイト

A. Thrと2つの水分子の  $F_o - F_c$  マップ ( $2.0 \sigma$ )。

B. Thr 結合サイト (Thr はマゼンタのスティックモデルで示す。chain A と chain B の残基はそれぞれ緑と青で示し、Thr の結合に関わる残基をスティックモデルで示した。)

### 2-3-4 キメラ AK BCC での Thr および Lys 耐性を与える変異の構造上の位置

当研究室におけるキメラ AK BCC の部位特異的変異体の阻害パターンによって明らかとなった Thr や Lys に対する感受性に変化を与えるアミノ酸残基が、決定された CgAK $\beta$  の結晶構造においてどの位置に存在するのかを図示した (Fig. 2-5A, B)。Thr に対しての感受性に変化を与えた変異が導入された残基は、実際の Thr 結合サイト周辺またはサブユニット間境界面に存在していた。また、Lys に対しての感受性に変化を与えたアミノ酸置換のあった場所は、Thr 結合サイト周辺の loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 (50-57) 及び、隣り合う2つの ACTドメインで構成されるエフェクター結合ユニットでの、Thr が結合していない site 2 の周辺であった。

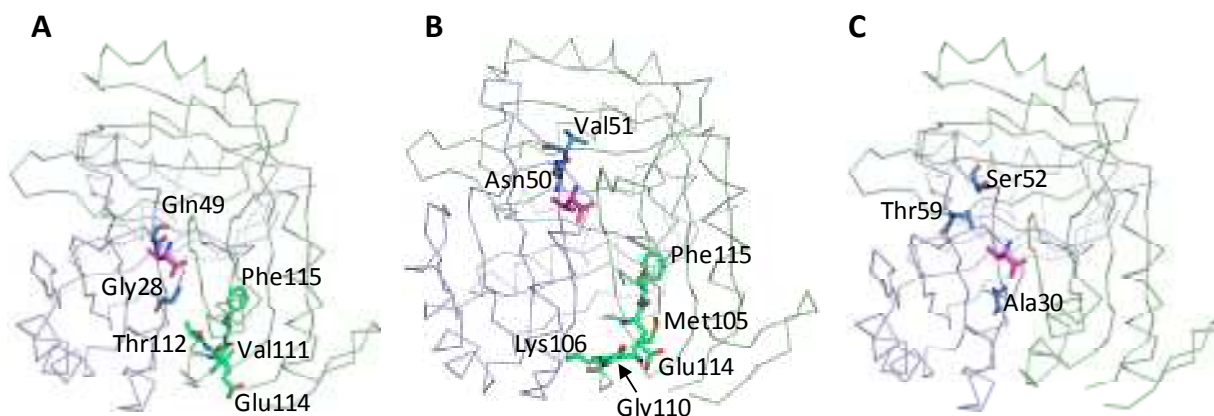


Figure 2-5 Thr や Lys、AEC に対する感受性に変化を与える変異の構造上の位置

- A. キメラ AK BCC において Thr に対する感受性に変化のあった変異導入部位
- B. キメラ AK BCC において Lys に対する感受性に変化のあった変異導入部位
- C. CgAK に AEC 耐性を与える変異導入部位

### 2-3-5 CgAK $\beta$ の変異体における Thr 結合によるオリゴマー状態の変化

酵素活性の制御と活性制御を担う $\beta$ サブユニットの Thr 結合によるダイマー化との関係性を調べるために、キメラ AK BCC において Thr 耐性の阻害パターンを示す変異を CgAK $\beta$  に導入して、それらの会合状態をゲルろ過クロマトグラフィー及び超遠心分析によって調べた。導入した変異は Gln49Ala、Val111Ala、Thr112Ala、Glu114Ala、Phe115Ala である。Table 2-4 に測定された分子量をまとめて示す。Gln49Ala や Thr112Ala、Glu114Ala を導入した変異型 CgAK $\beta$  では Thr を添加しない状態は野生型と同じくモノマーであったが、Thr の添加によるダイマー化は観察されなかった。一方、Val111Ala、Phe115Ala 変異体では Thr の存在下で



も非存在下でも 5 量体から 6 量体に相当するオリゴマー状態を取っていた。コントロールとして、BCC で野生型 BCC の阻害パターンと同じパターンを示した Thr131Ala や BCC に対して Lys 耐性を与えた Gly110Ala についても同様の分子量解析を行ったところ、どちらも野生型 CgAK $\beta$ と同じく Thr 非存在下ではモノマー、Thr 添加条件ではダイマーと見積もられた。

Table 2-4 CgAK $\beta$ 野生型および変異型の分子量測定

変異体	BCCでの阻害パターン	測定分子量 (kDa)				Thrによる変化
		ゲルろ過		超遠心分析		
		No additives	5 mM Thr	No additives	5 mM Thr	
Wild Type	-	23.0	33.8	20.2	36.0	M→D
Gln49Ala	Thr耐性	23.6	26.0	26.0	28.5	M→M
Val111Ala	Thr耐性	106.4	108.2	100.8	99.1	O→O
Thr112Ala	Thr耐性	22.8	26.7	19.2	28.8	M→M
Glu114Ala	Thr, Lys耐性	22.7	27.6	N.T.	N.T.	M→M
Phe115Ala	Thr, Lys耐性	107.6	109.7	N.T.	N.T.	O→O
Gly110Ala	Lys耐性	25.0	34.8	N.T.	N.T.	M→D
Thr131Ala	-	22.8	32.6	20.4	37.2	M→D
Ala40Val*	Thr耐性	26.2	26.2	N.T.	N.T.	M→M
Ser52Phe*	Lys耐性	27.6	35.6	N.T.	N.T.	M→D
Thr59Ile*	Thr耐性	28.2	29.1	N.T.	N.T.	M→M

N.T., not tested

M: monomer, D; dimer, O; oligomer

\*AEC耐性変異体

### 2-3-6 CgAK に AEC 体制を与えるアミノ酸変異の解析

*C. glutamicum* はアミノ酸発酵産業で重要なバクテリアであり、リジン高生産菌の取得を目指し、リジンアナログである AEC 耐性変異株が取得されている。この変異株においては AK の活性制御ドメイン、つまり $\beta$ サブユニットにいくつかの変異が確認されている[80, 81]。このうち3つの変異(Ala30Val, Ser52Phe, Thr59Ile)に注目し、CgAK に導入したところ確かに Lys, Thr を添加しても阻害がかからなくなった (Fig. 2-6A)。

CgAK $\beta$ の結晶構造においてこれら 3 つの変異は構造上どこに存在するのを見たとところ (Fig. 2-5C)、Ala30 と Thr59 については Thr 結合サイトのすぐ近くに存在して Thr 結合の安定化に寄与する残基であり、Ser52 は Thr 結合サイトを覆う loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 中のアミノ酸残基であった。そこで、これらの変異が Thr 結合やそれによる構造変化に影響を与えることで AEC 耐

性となっている可能性が考えられたため、これらの変異が $\beta$ サブユニットの Thr 結合によるダイマー化や BCC においてどのような阻害パターンを示すのかを調べた (Fig. 2-6B, Table 2-4)。Ala30Val と Thr59Ile の変異は BCC においては Thr 耐性を示し、これらの変異を持った CgAK $\beta$ は Thr を添加してもモノマーのままであった。一方、Ser52Phe が導入された BCC では Lys 耐性を示し、この変異を持った CgAK $\beta$ も野生型と同様に Thr によるダイマー化が見られた。以上の結果から、Ser52Phe のアミノ酸置換によって CgAK の Lys に対する感受性に変化が生じるのに対し、Ala30Val と Thr59Ile のアミノ酸置換によって実際には Thr に対する感受性が低下していることが分かった。

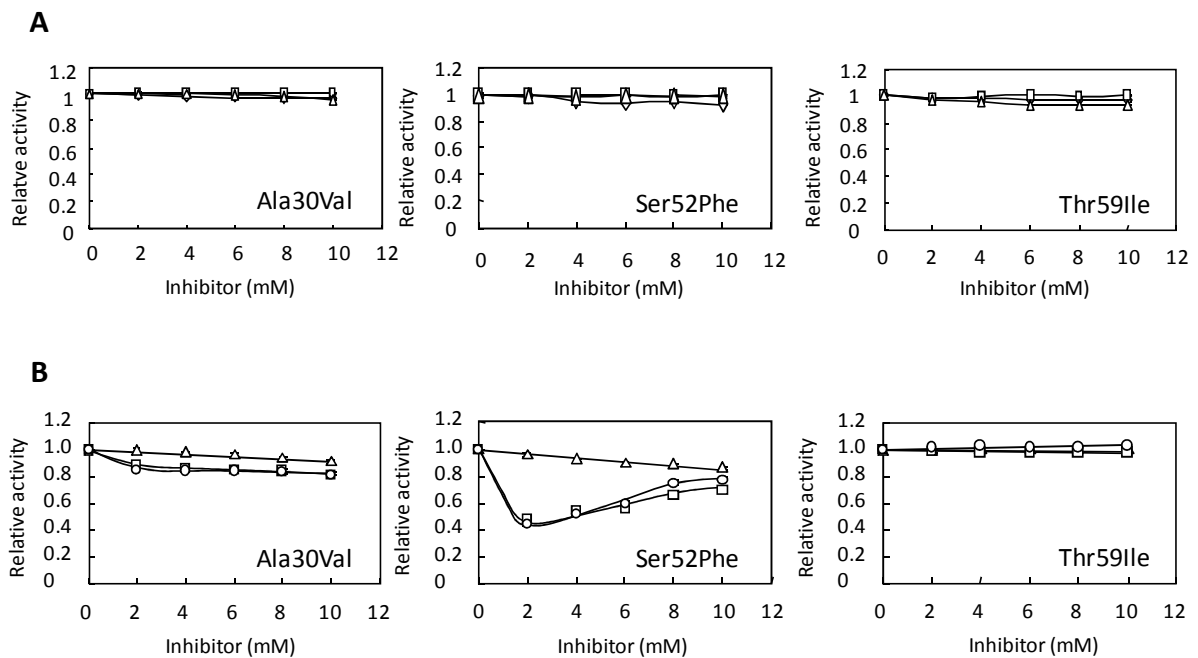


Figure 2-6 AEC 耐性変異をもつ CgAK と BCC の阻害プロファイル

A. CgAK における変異体の Lys や Thr による影響

B. キメラ AK BCC における変異体の Lys や Thr による影響

□, Thr; △, Lys; ○, Thr と Lys

## 2-4 考察

### 2-4-1 他の ACTドメインを持つタンパク質との比較

CgAK $\beta$ はホモダイマー構造を取っており、モノマー中に2つのACTドメインモチーフを持っていた。N末側のACT1は連続したポリペプチドによって $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ モチーフが形成されているが、C末側のACT2では連続したポリペプチドで構成されず、ACT1の前に存在する $\beta$  strandとACT1の後に存在する $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ とでACTドメインを形成していた。このような特徴は主オリゴマー型のAKであるAtAKIやEcAKIII、MjAKでも見られ、AKに限られた特徴であるといえる。

CgAK $\beta$ のACTドメイン同士のダイマー構成の仕方もこれまで明らかとなっているACTドメインを持つタンパク質では見られない特徴的な様式であった(Fig. 2-7)。CgAK $\beta$ では異なるサブユニット由来のACT1とACT2が隣り合ってエフェクター結合ユニットを構成しており、それが互いに垂直に向かい合うようにダイマーを形成していた。*E. coli*由来Threonine deaminase(TD)ではCgAK $\beta$ と同様に非等価なACTドメインが隣り合ってエフェクター(IleとVal)結合ユニットを形成しているが、これらの2つのACTドメインは連続して1つのポリペプチド鎖に存在する[82]。部位特異的変異体の解析により2つの異なるACTドメインで構成されるエフェクター結合ユニットの2か所にそれぞれIleとValが結合することが示されており、その位置は*E. coli*由来3PGDHのSer結合サイトに相当する[83]。3PGDHではモノマーあたりACTドメインは1つしか持たず、別のサブユニットのACTドメインとエフェクター結合ユニットを形成し、2つのACTドメインのinterfaceに2つのSer分子を結合する[55]。AtAKIやEcAKIII、MjAKのホモオリゴマー型AKでは、CgAKと同じくモノマー中に2個のACTドメインを持ち、活性制御ドメイン同士の相互作用でダイマーを形成していた。しかしながら、CgAK $\beta$ で見られたように1つのポリペプチド中の2つのACTドメインはお互いに垂直に配置していたが、ホモオリゴマー型AKでは等価なACTドメイン、つまり異なるサブユニット由来のACT1同士、ACT2同士が隣り合ってユニットを形成していた。そのため2つのエフェクター結合ユニットは非等価であり、阻害剤はAtAKIとEcAKIIIではACT1同士のinterfaceに、MjAKではACT2同士のinterfaceに結合しており、もう一方のエフェクター結合ユニットには何も結合していない。このように、CgAK $\beta$ のACTドメインの構成はこれまでに立体構造の決定されているタンパク質の中には見られなかった特徴的な様式である。ホモオリゴマー型の四次構造を持つAKと $\alpha_2\beta_2$ 型であるCgAK $\beta$ でもエフェクター結合ユニットの形成様式

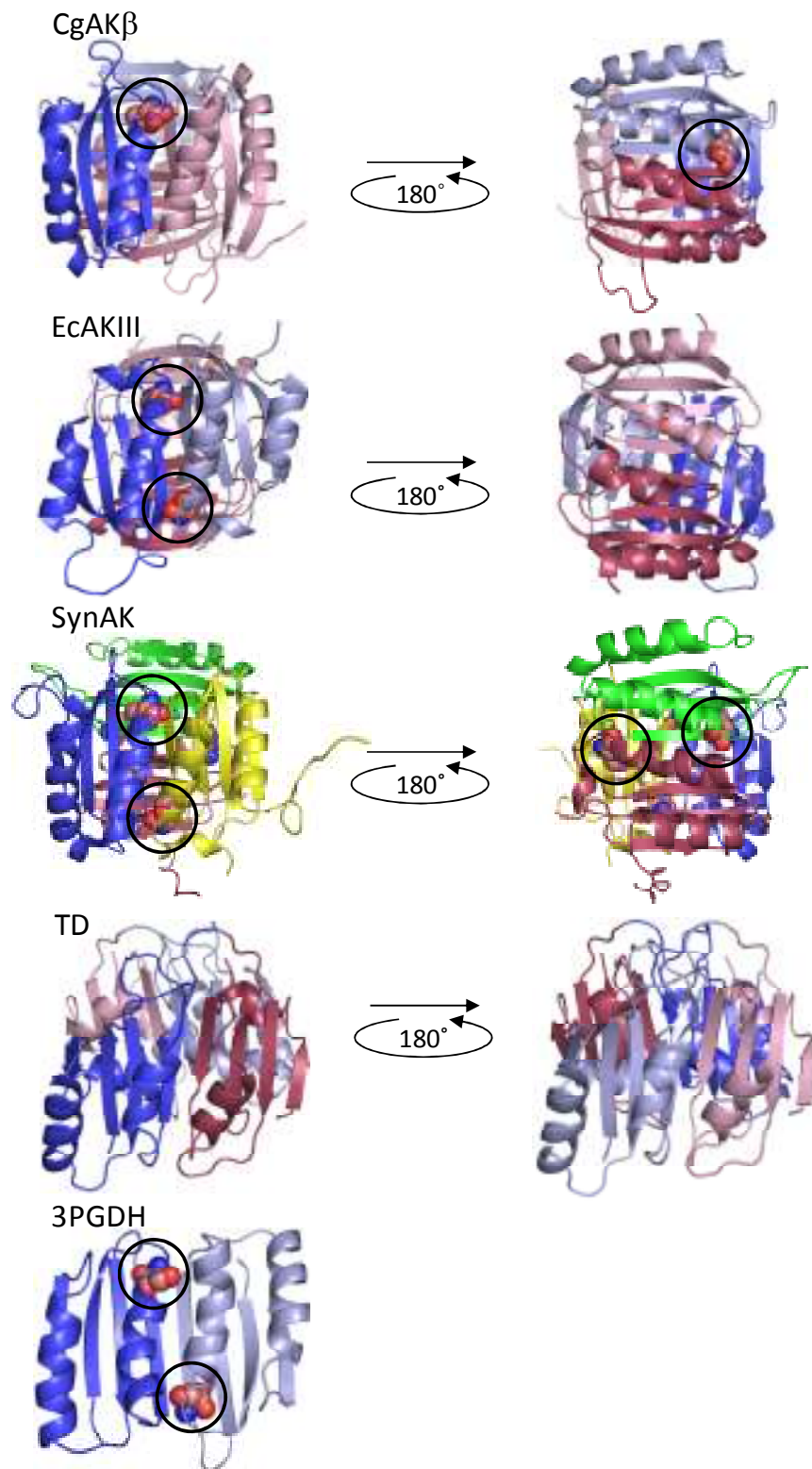


Figure 2-7 他の酵素との ACTドメインの相互作用やリガンド結合位置の比較  
 青, ACT1; 赤, ACT2; 緑, ACT3; 黄, ACT4(薄い青と赤の単位は別のサブユニット  
 由来であることを示す)

が異なることから、CgAK $\beta$ で見られた ACTドメインの構成は $\alpha_2\beta_2$ 型 AK に共通の特徴であると考えられる。また、最近決定された *Synechosystis* の AK (SynAK) は活性制御ドメインが 4 つの ACTドメイン (N 末側から ACT1、2、3、4) で構成されている。1 つのサブユニット由来の ACT1 と ACT4、ACT2 と ACT3 がそれぞれ相互作用して 2 つのエフェクター結合ユニットを形成し、お互いが $\beta$  sheetを向かい合わせて垂直に相互作用していた[57]。活性制御ドメインの構成は $\alpha_2\beta_2$ 型の CgAK のものとよく似ていたが、全てが 1 本のポリペプチド鎖で構成されるという特徴を持っていた。

#### 2-4-2 リガンド結合サイトの比較

CgAK $\beta$ において Thr は ACT1 と ACT2 でつくられるエフェクター結合ユニットの結合部位のうち site 1 にのみ結合していた。この結合位置は 3PGDH や AtAKI などにおけるエフェクター結合部位とほぼ同じ位置であった (Fig. 2-8)。これらのタンパク質でリガンドの結合に関わるアミノ酸残基は loop  $\alpha_3$ - $\beta_7$  /  $\alpha_{12}$ - $\beta_{14}$  /  $\alpha_{10}$ - $\beta_{14}$  と loop  $\beta_2$ - $\alpha_1$  /  $\beta_{13}$ - $\alpha_{12}$  /  $\beta_{13}$ - $\alpha_{10}$  (それぞれ CgAK $\beta$  / 3PGDH / AtAKI) に主に存在しているがリガンド結合に関わる個々のアミノ酸残基には違いがみられる。CgAK $\beta$ では 2 つの水分子が Thr のカルボキシル基の 2 つの酸素原子との水素結合ネットワークに関与していたが、3PGDH においては CgAK $\beta$ と同じような位置に Ser のヒドロキシル基の酸素原子との結合に 1 分子のみ関与しており、AtAKI ではそのような Lys のカルボキシル基の安定化に寄与する水分子は観察されていない。それぞれのリガンドであるアミノ酸の結合方向も異なっており、CgAK $\beta$ や AtAKI ではそのカルボキシル基が helix  $\alpha_1$  の方を向いて helix dipole の N 末の正電荷による安定化が見られるが、3PGDH では loop  $\beta_{13}$ - $\alpha_{12}$  の方を向いている。リガンド結合位置は ACTドメイン間で保存されているが、その細かい結合に関与する残基やリガンドの結合方向には多様性が見られると考えられる。

#### 2-4-3 Thr の結合によるダイマー化

Thr がサブユニット間に結合することから、この結合がダイマー構造の安定化に寄与している可能性が考えられたため、Thr の有無による $\beta$ サブユニットのオリゴマー状態について調べた。その結果、 $\beta$ サブユニットは Thr の添加によりモノマーからダイマーへと変化することが示された。さらに、キメラ AK の BCC において Thr 耐性を与える変異を CgAK $\beta$ に導入し、その変異体の Thr によるオリゴマー状態の変化を調べたところ、BCC に Thr 耐性を与える変異を

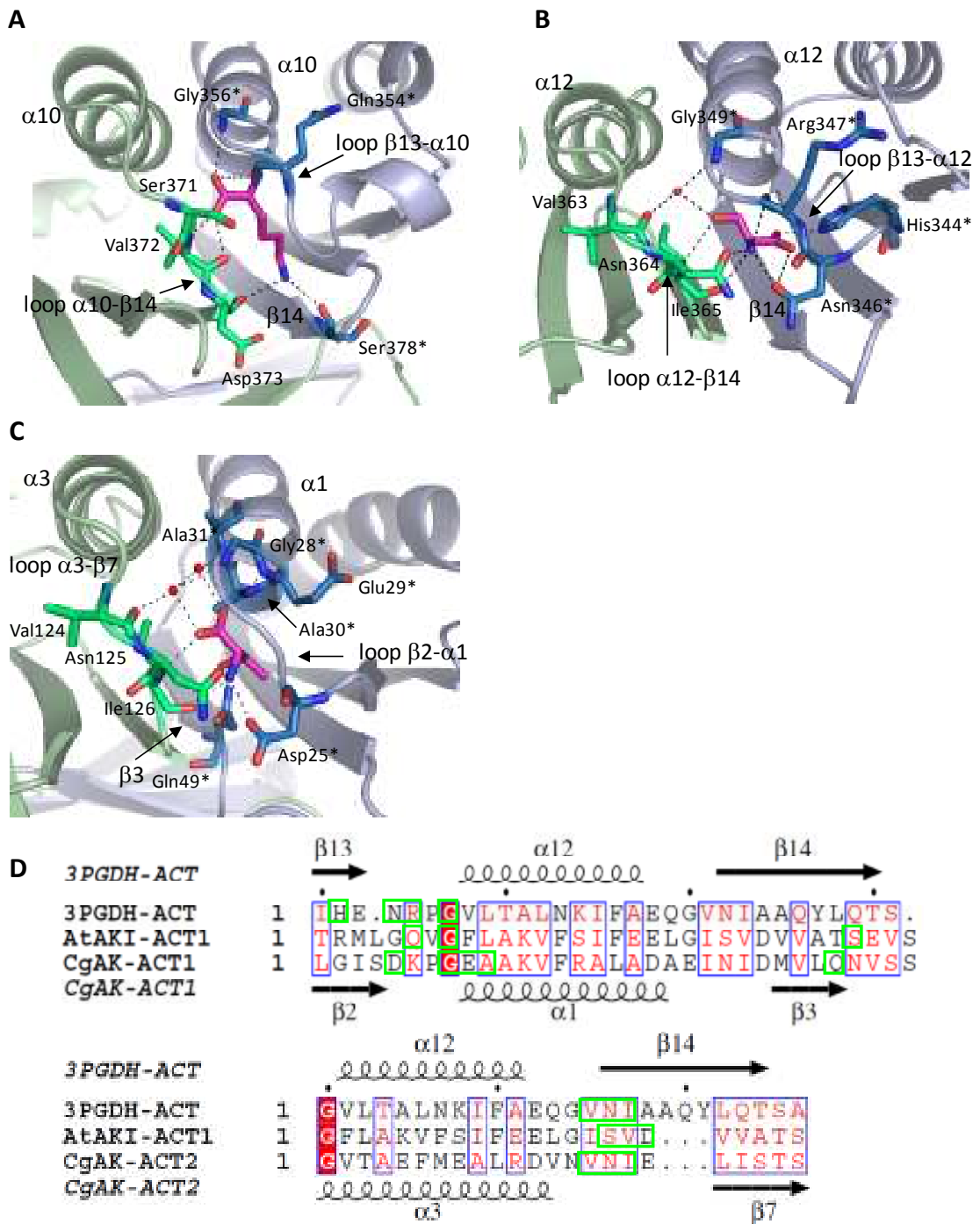


Figure 2-8 他の ACTドメインとのリガンド結合サイトの比較

- A. AtAKI の Lys 結合サイト
- B. 3PGDH の Ser 結合サイト
- C. CgAKβ の Thr 結合サイト
- D. アミノ酸配列アラインメント (上段は loop β2-α1/β13-α12/β13-α10, 下段は loop α3-β7/α12-β14/α10-β14 (それぞれ CgAKβ/3PGDH/AtAKI) 周辺のアラインメント、リガンド結合に関わる残基を囲った)

持つ CgAK $\beta$ では Thr 存在下でもモノマーのまま、または Thr の有無に関わらず多量体構造を取ることが分かった。Thr を添加してもモノマーのままであった変異のうち、Gln49Ala の場合では、Gln49 が Thr の結合に関与することから Thr を結合できなくなったことが原因であると考えられる。Thr112Ala や Glu114Ala では、これらが dimer interface に存在することから、ダイマーを構成するためのサブユニット間相互作用ができなくなってしまったと考えられる。また、Thr 存在下、非存在下どちらでも多量体となった変異体も dimer interface に存在することから、ダイマーを構成するためのサブユニット間相互作用が壊れるだけでなく、別の結合を形成してしまっていると考えられる。いずれの結果からも、変異の導入により Thr による $\beta$ サブユニット(活性制御ドメイン)のダイマー化が起こらなくなることと、BCC において Thr 耐性をもたらすことが一致しており、この Thr による活性制御ドメイン(サブユニット)のダイマー化が CgAK の Lys と Thr における協奏阻害において必須な過程であることが示された。

#### 2-4-4 AEC 耐性変異の実際の役割

C. glutamicum において Lys アナログである AEC を用いたスクリーニングにより得られたフィードバック阻害耐性の AEC 耐性変異株は、その変異を AK の活性制御ドメインに持つ。これらのうち Ala30Val、Ser52Phe、Thr59Ile の変異が CgAK $\beta$ の立体構造上でどこに存在するかを調べたところ、AEC は Lys アナログであるにもかかわらず、全て Thr 結合サイト周辺に位置していた。そこで、BCC や CgAK $\beta$ にこれらの変異を導入し、その阻害パターンや Thr の添加によるダイマー化の有無について調べたところ、Ala30Val と Thr59Ile については実際に Thr 耐性を与える変異であることが分かった。これらの残基はどちらも Thr の認識に関わっており、嵩高いアミノ酸に置換されることで Thr 結合サイトを埋めて Thr 結合を阻害してしまうと考えられる。一方、Ser52Phe 変異体では Lys 耐性を与えることが分かった。Ser52 は BCC において Lys 耐性型の阻害パターンを示した Asn50Ala や Val51Ala の存在する Thr 結合サイト周辺の loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 にある残基であり、Ser の Phe への置換によって Thr 結合サイトが埋まってしまうとは考えにくい。このことから、CgAK の Ser52Phe 変異体では Thr に対する感受性は保ったまま(結合能は保持したまま)、Lys 結合を妨げる、または Lys 結合による構造変化を妨げていると考えられる。第三章で詳しく述べるが、Lys 結合部位はこの Ser52 とは離れた部位に存在することが全長の結晶構造から明らかとなったが、この Ser52Phe による活性制御解除への影響はいまだ不明な点が残されている。

Lys アナログである AEC を用いて得られた CgAK のフィードバック阻害耐性変異体の中に、

Thr に対する感受性が低下したものが含まれていたということは、予想と異なる結果であった。いずれにしろ、AEC 耐性変異の結果も、CgAK の Lys と Thr による協奏阻害において、まず Thr 結合による $\beta$ サブユニット(活性制御ドメイン)のダイマー化が必須な過程であることを支持している。

#### 2-4-5 Lys 結合部位の予測

キメラ AK BCC の阻害パターンの解析から、いくつかのアミノ酸残基が Lys 結合またはそれによる構造変化に関与していることが示されている。これらのアミノ酸残基は CgAK $\beta$ の立体構造上では 2 か所に固まって存在していた。Met105、Lys106、Gly110、Glu114、Phe115 は helix  $\alpha$ 3 上の dimer interface や loop  $\beta$ 6- $\alpha$ 3 に存在して、ACTドメインで形成されるエフェクター結合ユニットのうち site 2 近くに分布しており、Asn50 と Val51 は Thr の結合している site 1 を覆うように存在する loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 上に位置していた (Fig. 2-5B)。

*A. thaliana* 由来の Thr 感受性の Aspartate kinase-homoserine dehydrogenase (AK-HSDH) では、部位特異的変異体の解析から 2 つの ACTドメインによって構成される活性制御ドメインには 2 つの Thr 結合サイトがあるといわれている[84]。その 2 か所の結合サイトは CgAK $\beta$  では Gln49 と Thr131 に相当する。CgAK $\beta$ において Gln49 がリガンド結合に関与していることは結晶構造から明白である (Gln49-N<sup>62</sup> が Thr のヒドロキシル基を認識)が、一方、Thr131 は BCC における Ala への変異体解析では特に特徴的な阻害パターンを示さず、Lys、Thr のどちらの結合にも関与しないと考えられた。しかし、Thr131 はちょうど strand  $\beta$ 7 の C 末に存在し、helix  $\alpha$ 3 の N 末にも近く、つまり、BCC において Lys 結合やそれによる構造変化に関与していることが示唆された Met105、Lys106、Gly110、Glu114、Phe115 が位置する site 2 の近くに存在している (Fig. 2-9B)。Thr131 が直接 Lys の結合に関与している可能性は考えにくい、周辺に Lys が結合する可能性は十分あるといえる。

CgAK $\beta$ と Thr 感受性である TtAK の $\beta$ サブユニットのアラインメント (Fig. 2-9A) から、CgAK $\beta$  では C 末に 11 残基からなる ACTドメインの構成には関係しない $\beta$  strand ( $\beta$ 9)を持つことが分かる。結晶構造中でこの $\beta$  strand は一部ではあるが観察され、その位置は Met105、Lys106、Gly110 そして CgAK $\beta$ サブユニットの N 末近くに存在していた (Fig. 2-9B)。CgAK が $\alpha_2\beta_2$ 型構造を取り、CgAK $\beta$ の 2 つのサブユニットのどちらかの N 末には触媒ドメインがつながることを考えると、この strand  $\beta$ 9 が Lys による制御に何らかの形でかかわり、Lys が活性制御ドメイン ( $\beta$ サブユニット)と触媒ドメインの間に結合する可能性も考えられる。



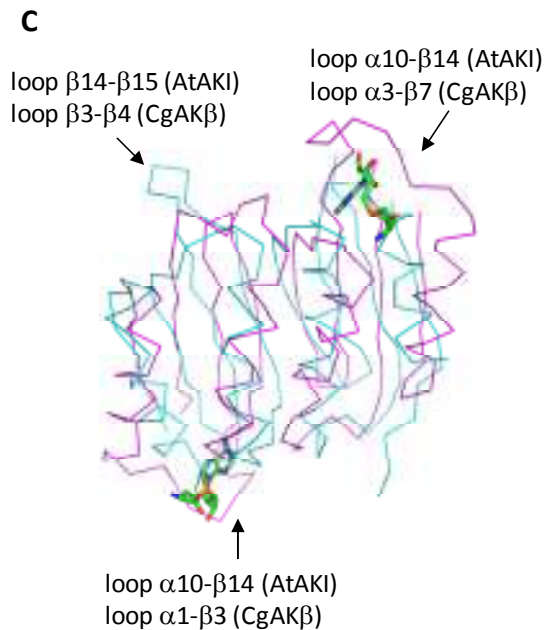
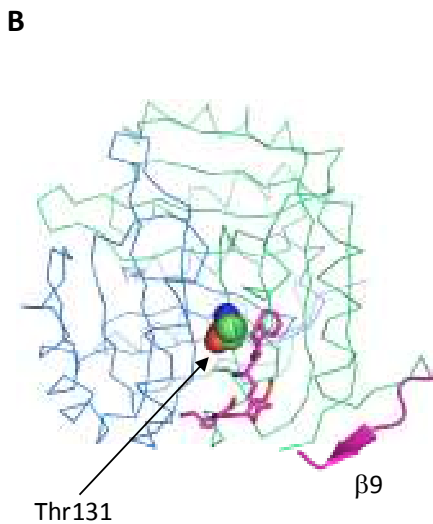
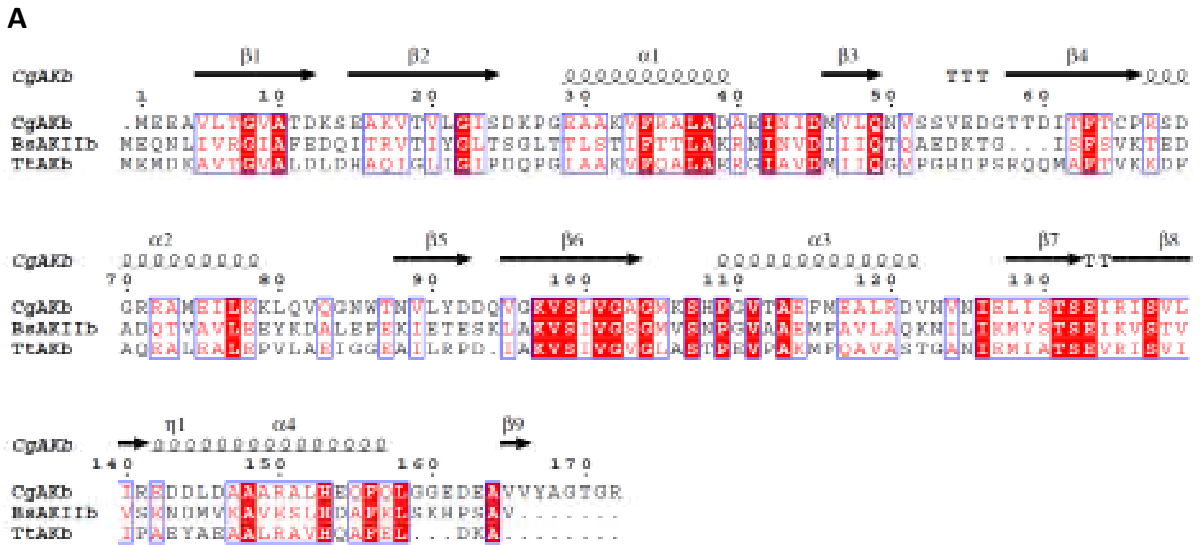


Figure 2-9 リジン結合サイトの予測

- $\alpha_2\beta_2$  型 AK の  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列アラインメント (CgAK, BsAKII, TtAK)
- Thr131 及び C 末の strand  $\beta_9$  の位置。マゼンタのスティックモデルは BCC において Lys 感受性に影響を与える変異の位置。
- CgAK $\beta$  (シアン) と AtAKI の ACT ドメイン (マゼンタ) の重ね合わせ。SAM を緑のスティックモデルで示す。

また、BCC において明らかとなった Lys 結合やそれによる構造変化に関わるであろうアミノ酸残基のうちの Asn50 と Val51 は、Met105 などがある site 2 からは離れた、むしろ Thr 結合サイトに近い。Lys と SAM によって相乗的に阻害を受ける[47]AtAKI の結晶構造で、Lys は CgAK $\beta$  の Thr 結合サイトに対応する場所に結合しているが、SAM は ACT ドメインのエフェクター結合部位ではなく、ACT1 の loop  $\alpha$ 10- $\beta$ 14 という長い loop に囲まれるように結合している (Fig. 2-9C)。AtAKI における SAM 結合サイトの loop に対応する CgAK $\beta$  の loop ( $\alpha$ 1- $\beta$ 3 および  $\alpha$ 3- $\beta$ 7) は Lys が SAM のように結合するには短すぎ、ここには結合しないと考えられる。その一方で、CgAK $\beta$  において顕著に長い loop としてあげられるのは、Asn50 や Val51、またアミノ酸置換により AEC 耐性を獲得する Ser52 が存在する loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 である。CgAK における Lys 結合サイトの候補としてこの loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 も考えられ、さらにこの loop は Thr 結合に関与する Gln49 の非常に近くに存在するため、CgAK における Lys と Thr による協奏阻害機構に何らかの役割を持つことが示唆される。

第三章において後述するが、CgAK 全長構造の決定により、Lys は活性制御ドメインのエフェクター結合ユニットの site 2 に結合することが示された。このことから、キメラ AK BCC において Met105 などの site 2 周辺の残基の変異体が Lys 耐性となったのは Lys 結合に直接影響があったからであると考えられる。一方で Thr 結合サイト近くの loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 に存在する Asn50 や Val51、Ser52 における変異体で Lys 耐性を示したのかは、おそらく Lys 結合による構造変化に関与していると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。

#### 2-4-6 CgAK の協奏阻害機構の推定

本章の研究を行っている間に、ホモオリゴマー型の AK である EcAKIII において、基質の Asp に加えて阻害剤である Lys が結合した T-state の構造と基質の Asp と ATP アナログである MgADP が結合した R-state の構造が決定され、そのフィードバック阻害機構が提唱された [38]。それによれば、Lys の結合により 4 つの ACT ドメインで構成される活性制御ドメインのダイマーに構造変化が起こり、その影響で ATP 結合サイトを覆う loop の位置に変化が生じ、ATP の結合が妨げられるという阻害メカニズムであった。しかし、CgAK は  $\alpha_2\beta_2$  型であるため ACT ドメインを 8 個持ち、Lys と Thr という 2 つのエフェクターを結合することから、おそらく EcAKIII とは阻害機構の詳細は異なると考えられる。

本章では、CgAK $\beta$  が Thr の結合によってモノマーからダイマーへと変化することや、BCC での解析によって Thr 結合に影響を与えるとされたアミノ酸変異を持った CgAK $\beta$  はこのダイ

マー化が起こらなくなることを示し、この Thr 結合による $\beta$ サブユニット(活性制御ドメイン)のダイマー形成が CgAK の活性制御に必須であることが明らかとなった。*Saccharomyces cerevisiae* 由来のホモオリゴマー型の AK でも阻害剤結合によって分子量の変化、すなわちサブユニットの解離・会合を伴う構造変化を起こすことが示されている[85]。また、Shiio らによっても Thr の結合が Lys に対する親和性を上昇させるという報告もあり[26]、CgAK の Lys と Thr による協奏阻害機構は Thr の結合による $\beta$ サブユニットと $\alpha$ サブユニットの活性制御ドメインの相互作用の形成と、それに続く Lys 結合による構造変化の 2 段階に分けられることが示唆された。

## 第三章 *Corynebacterium glutamicum* 由来の $\alpha_2\beta_2$ 型アスパラギン酸キナーゼの活性制御機構の解析

### 3-1 背景と目的

第二章では *C. glutamicum* 由来 AK において活性制御を担う $\beta$ サブユニットの Thr 結合型の結晶構造を決定し、Thr による $\beta$ サブユニットと $\alpha$ サブユニット内の活性制御ドメインのダイマー化が CgAK による Lys と Thr の協奏阻害における必要不可欠な、1 段階目の構造変化であることを示した。しかしながら、阻害剤の 1 つである Lys の結合部位やこれら阻害剤の結合による触媒ドメインへの影響は示せていない。

本研究を行っている間に CgAK とは異なるホモオリゴマー型の AK の結晶構造が *A. thaliana* AKI (AtAKI)、*E. coli* AKIII (EcAKIII)、*Methanocaldococcus jannaschii* AK (MjAK) で報告されている[38, 59, 67]。これらは全てホモダイマーで存在し、活性制御ドメインでのみ dimer interface を形成している(Fig. 3-1)。このうち EcAKIII と MjAK では基質が結合した活性型構造(R-state)と阻害剤(それぞれリジン、スレオニン)が結合した不活性型構造(T-state)の結晶構造が決定されており、その構造比較から大まかな活性調節機構が示されている。この 2 つの AK はどちらも活性制御ドメイン内に阻害剤を結合しており、阻害剤の結合によって触媒ドメインの N-lobe と C-lobe の間が開いた状態が安定化され、反応が進まないことで不活性型となることが示されている。MjAK では阻害剤であるスレオニンが ACT ドメインで構成される活性制御ドメインダイマーのエフェクター結合部位だけでなく、活性中心やその他の表面部位などに結合すると報告されている。CgAK はこれらの AK とは異なり $\alpha_2\beta_2$ 型ヘテロテトラマー構造を取り、第二章でも示したように ACT ドメインの相互作用がホモオリゴマー型 AK とは異なっているため、活性制御機構及びそれに関わるサブユニット間相互作用が異なることが予想され、ホモオリゴマー型 AK との共通点、相違点にも興味を持たれる。

CgAK の四次構造や協奏阻害機構を明らかにするためには Lys、Thr の結合した不活性型や基質の結合した活性型の $\alpha_2\beta_2$ 型の全長構造を決定する必要がある。これまで、当研究室では CgAK の組換えタンパク質の発現や精製が試みられてきたが、 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが精製過程で容易に解離してしまうなどの問題点があり、うまく解析されてこなかった。しかし、第二章で明らかにした Thr 結合によって活性制御ドメイン(サブユニット)がダイ

マー化する性質を利用し、Thr を添加して精製を行うことでこの問題を解決し、 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットを 1 対 1 で会合した状態で精製することに成功した。本章では、*C. glutamicum* 由来の AK の $\alpha_2\beta_2$ 型の Lys・Thr の結合した不活性型構造、Thr のみの結合した活性型構造、さらにフィードバック阻害耐性変異体の結晶構造について述べるとともに、それらの比較から明らかになった CgAK の協奏阻害機構について論じる。

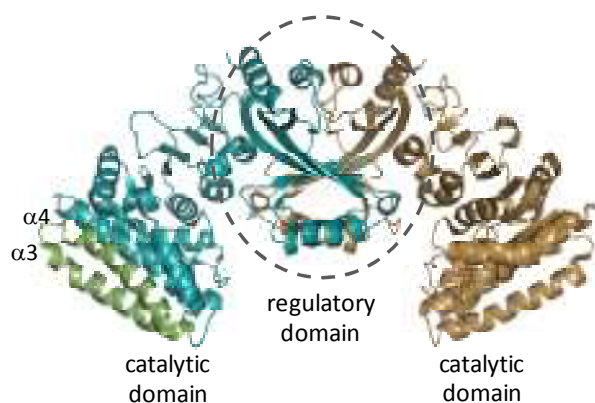


Figure 3-1 ホモオリゴマー型 AK の構造 (*E. coli* 由来 AKIII)  
helix  $\alpha_3$  及び $\alpha_4$  を緑で示した。

## 3-2 方法

### 3-2-1 菌株および試薬類

遺伝子操作に用いた試薬や培地などは第二章に記載したものと同一のものを用いた。

タンパク質発現においては第二章に記したものに加えて *E. coli* BL21(DE3) [*F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ(DE3)*] を用いた。また、結晶化スクリーニングにおいては Emerald Biosystems のキットも用いた。

### 3-2-2 発現プラスミドの構築

結晶化を目的とした CgAK の野生型およびフィードバック阻害耐性変異体 (Ser301Phe、以後 CgAK-S301F と記す) の発現プラスミドの構築は以下のように行った。

まず、当研究室においてクローニングされていた CgAK 遺伝子を含むプラスミドを鋳型として PCR により CgAK の  $\alpha$  サブユニット及び  $\beta$  サブユニットの遺伝子を増幅した。使用したプライマーを以下に示す。このプライマーにより CgAK $\beta$  の開始コドンの上流に pET26b(+) と同様の ribosomal binding site (rbs) 配列が付加され、C 末端には (His)<sub>6</sub> タグが付加される。

$\alpha$  サブユニット

5'-CGGGATCCCATATGGCCCTGGTCGTACAG-3'

5'-GGGGAATTCTCAGCGTCCGGTGCCTGCATA-3'

$\beta$  サブユニット

5'-CCCGAATTCAAGAAGGAGATATACAGATGGAAGAAGCAGTCCTT-3'

5'-GGCCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGTCCGGTGCCTGCATA-3'

増幅した断片をそれぞれ *Bam*HI/*Eco*RI ( $\alpha$  サブユニット)、*Eco*RI/*Xho*I ( $\beta$  サブユニット) で処理し、pBluescript II SK(+) の MCS に連結した。得られたクローンの塩基配列の確認を行い、これらをそれぞれ pBS-CgAK $\alpha$ ( $\alpha$ - $\beta$ )、pBS-CgAK $\beta$ ( $\alpha$ - $\beta$ ) と名付けた。 $\alpha$  サブユニット中の SD 配列が宿主の大腸菌内で働いてしまい、C 末に (His)<sub>6</sub> タグのついていない  $\beta$  サブユニットが発現し、 $\beta$  サブユニットの均一性が失われてしまうのを避けるため、pBS-CgAK $\alpha$ ( $\alpha$ - $\beta$ ) を鋳型として以下に示すプライマーで変異を導入し、アミノ酸を変えることなく  $\alpha$  サブユニット中の SD 配列の機能をなくした。

5'-TTGATTGCCGGCTCCATGGAAGATATTCCTGTGGAA-3'

5'-TTCCACAGGAATATCTTCCATGGAGCCGGCAATCAA-3'



度を 500 mM まで段階的に上昇させて目的タンパク質を溶出した。目的タンパク質を含む画分を VIVASPIN (Sartorius) により 2 ml まで濃縮し、これをあらかじめ Buffer D で平衡化しておいた HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) に供し、溶出画分を精製タンパク質とした。組換えタンパク質の精製度は SDS-PAGE によって確認した。CgAK-S301F についても同様に Lys と Thr を含む Buffer D を用いて精製を行った。また、Thr のみを添加した条件での結晶化にはこの溶出画分を Buffer E (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM Thr) に対して透析を行い、結晶化に用いた。

精製サンプルを VIVASPIN で濃縮し、10 mg/ml に調製し、10 mM Thr や 10 mM Thr、10 mM Lys の両方を添加した条件で結晶化に供した。結晶化は蒸気拡散法にて 20 °C で行った。Hampton Research や Emerald Biosystems のスクリーニングキットを用いた結晶化スクリーニングを行い、得られたいくつかの条件に対して結晶化条件の最適化を行った。その結果、野生型の CgAK では Lys・Thr 結合型で 1.2 M tri-Sodium citrate、0.1 M Tris-HCl pH 8.5 の条件で、Thr 結合型で 2.2 M Ammonium sulfate、0.05 M HEPES-NaOH pH 7.5、2.1 % (w/v) PEG400 の条件で、さらに CgAK-S301 変異体での Lys・Thr 結合型で 15 % (w/v) PEG4000、0.05 M tri-Sodium citrate pH 5.6、0.1 M Ammonium acetate の条件で良質の結晶が得られた。

#### 3-2-4 CgAK 全長の構造決定

X線回折データ収集の前に、結晶をクライオプロテクタントとして 20 % (v/v) Ethylene glycol、Glycerol、そして PEG400 (それぞれ CgAK-Lys・Thr、CgAK-Thr、CgAK-S301F) を含むリザーバー溶液に移し、窒素ガスによって 100 K まで急速に冷やし、クライオ条件でデータを測定した。回折データの収集は Photon Factory の BL-6A (CgAK-Lys・Thr)、BL-5 (CgAK-Thr)、そして NW12 (CgAK-S301F) で行った。X線の波長は BL-6A では 0.978 Å、その他では 1 Å であり、反射イメージは各ステーションに設置されている CCD カメラを用いて収集した。反射データはプログラム HKL2000[70]を用いて指数付け、積分、スケール処理を行った。

CgAK-Lys・Thr の結晶は結晶学的非対称単位に 1 分子の  $\alpha_2\beta_2$  単位を含み、空間群  $I4$  に属していた。この結晶の格子定数は  $a = b = 162.2$  Å、 $c = 133.9$  Å であった。CgAK-Lys・Thr の構造決定は第二章で示した CgAK $\beta$  の構造 (PDB ID: 2DTJ) と MjAK (PDB ID: 2HMF) の触媒ドメインから 2 つの  $\alpha$  helix (残基番号 67-117) を除いた部分をサーチモデルとして、



CCP4[71]のMOLREP[72]を用いた分子置換法によって行った。CgAK-ThrとCgAK-S301Fの結晶は非対称単位に4つの $\alpha_2\beta_2$ を持ち、どちらも空間群  $P1$  に属していた。これらの構造はCgAK-Lys・Thrの構造をモデルにした分子置換法によって決定した。電子密度と照らし合わせたモデルの構築や精密化はCoot[86]、Refmac5[87]、CNS1.2[74]を用いた。さらに、TLSMD サーバー[88]やRefmac5によって決定されたサブドメインによるTLS refinementも行った。プログラム MolProbity[89]を用いてタンパク質構造の妥当性を評価したところ、Ramachandran plot において 97.2 % (CgAK-Lys・Thr)、96.1 % (CgAK-Thr)、95.6 % (CgAK-S301F)の残基がFavored regionに存在していた。本章の図はPyMOL[77]を用いて作製した。

### 3-2-5 CgAK 変異体の調製

活性測定に用いたCgAKの変異体はpBS-CgAK $\alpha$ ( $\alpha$ - $\beta$ )やpBS-CgAK $\beta$ ( $\alpha$ - $\beta$ )を鋳型として部位特異的変異を導入して作製した。置換するアミノ酸のコードンの5'側と3'側にそれぞれ15塩基のタグを付けたプライマーを用いて Quik-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて変異を導入し、それぞれ pET26b(+)のMCSに野生型のpET-CgAK( $\alpha$ - $\beta$ )と同様に導入した。

この発現プラスミドで *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を形質転換し、Kanamycin と Chloramphenicol を含む2×YT培地で前培養を行い、この培養液を上記培地が200 ml 入った坂口フラスコに1%植菌し、OD<sub>600</sub>が0.6程度になるまで37℃で振盪培養した。終濃度0.1 mMとなるようにIPTGを添加し、30℃で12-14時間培養しタンパク質発現を誘導した。菌体を遠心で回収し、Buffer Aで懸濁、洗浄後、Buffer Eで再懸濁し超音波破碎を行った。破碎液を遠心し上清を粗抽出液とした。この粗抽出液を20 mM Imidazole pH 7.5を含むBuffer Eで平衡化したNi<sup>2+</sup>アフィニティーカラムに供し、段階的にImidazole濃度を上げていき目的タンパク質を溶出させた。目的タンパク質を含む画分をVIVASPINで適当な濃度になるまで濃縮し、活性測定に用いた。

### 3-2-6 活性測定

CgAKの部位特異的変異体の活性測定は第二章と同様の方法で行った。ただしLysに対する感受性を調べるため、反応溶液には常に10 mM Thrを添加することとし、Lys濃度を変化させて活性への影響を調べた。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 $\alpha_2\beta_2$ 型 CgAK の全体構造

$\alpha_2\beta_2$  型 CgAK 全長の 3 つの結晶構造を決定することに成功し、i) Lys・Thr が結合した不活性型の結晶構造、ii) Thr のみが結合した活性型構造、iii) Lys・Thr が結合した Ser301Phe 変異を持つ CgAK のフィードバック阻害耐性変異体の構造をそれぞれ、2.50 Å、2.59 Å、2.47 Å 分解能で決定した (Fig. 3-2A-C)。データ収集および構造精密化の統計値は Table 3-1 にまとめて示す。Lys・Thr を結合した CgAK の構造は非対称単位中に 1 分子の  $\alpha_2\beta_2$  ヘテロテトラマー、4 分子の Thr、3 分子の Lys、そして 234 の水分子を含んでいた。chain A と chain C は  $\alpha$  サブユニットを、chain B と chain D は  $\beta$  サブユニットを示す。 $\alpha$  サブユニットの触媒ドメインは AAK family でよくみられる特徴的な fold を取っていた (Fig. 3-2D)。CgAK の  $\alpha_2\beta_2$  構造は 2 つの  $\alpha$  サブユニット間の相互作用と、 $\beta$  サブユニットと  $\alpha$  サブユニット内の活性制御ドメインとの間の相互作用によって形成されていた。阻害剤である Lys と Thr はこの  $\beta$  サブユニットと  $\alpha$  サブユニットの活性制御ドメインで構成される活性制御ドメインダイマーにそれぞれ Lys が 1 分子、Thr が 2 分子結合していた。Lys と Thr が結合しているときには CgAK は活性を持たないのでこの Lys と Thr を結合した結晶構造は阻害型 (T-state) を示していると考えられ、以後この構造を CgAK-T と呼ぶ。

CgAK-Thr の結晶では非対称単位に 4 つの  $\alpha_2\beta_2$  ヘテロテトラマー、15 分子の Thr、そして 256 の水分子を含んでいた。chain A、C、E、G、I、K、M、O は  $\alpha$  サブユニットを、chain B、D、F、H、J、L、N、P は  $\beta$  サブユニットを示す。Chain I では  $\alpha$  サブユニットの site 1 における Thr は観察されなかった。この構造には CgAK の基質である ATP や Asp は含まれていないが、CgAK は Thr のみの存在下では活性を保持しているため、この構造が活性型 (R-state) を示していると考えられる。以後この構造を CgAK-R\* と呼ぶ。

同様に、CgAK-S301F も CgAK-R\* と同様に空間群 P1 で結晶化され、非対称単位に 4 つの  $\alpha_2\beta_2$  ヘテロテトラマー、16 分子の Thr、7 分子の Lys、そして 389 の水分子を含んでいた。chain I の Lys 結合サイトには何も結合していなかった。CgAK-R\* と CgAK-S301F の  $\alpha_2\beta_2$  単位のサブユニット構成は CgAK-T のものと同様であった。

CgAK-R\* や CgAK-S301F の結晶構造では非対称単位中に 4 つの  $\alpha_2\beta_2$  が含まれるが、CgAK-T では 1 つの  $\alpha_2\beta_2$  しか見られない。CgAK-T の結晶構造でも結晶の対称性から、4 回軸を当てはめると 4 つの  $\alpha_2\beta_2$  から構成されるように見える。しかしながら、CgAK は Thr 存

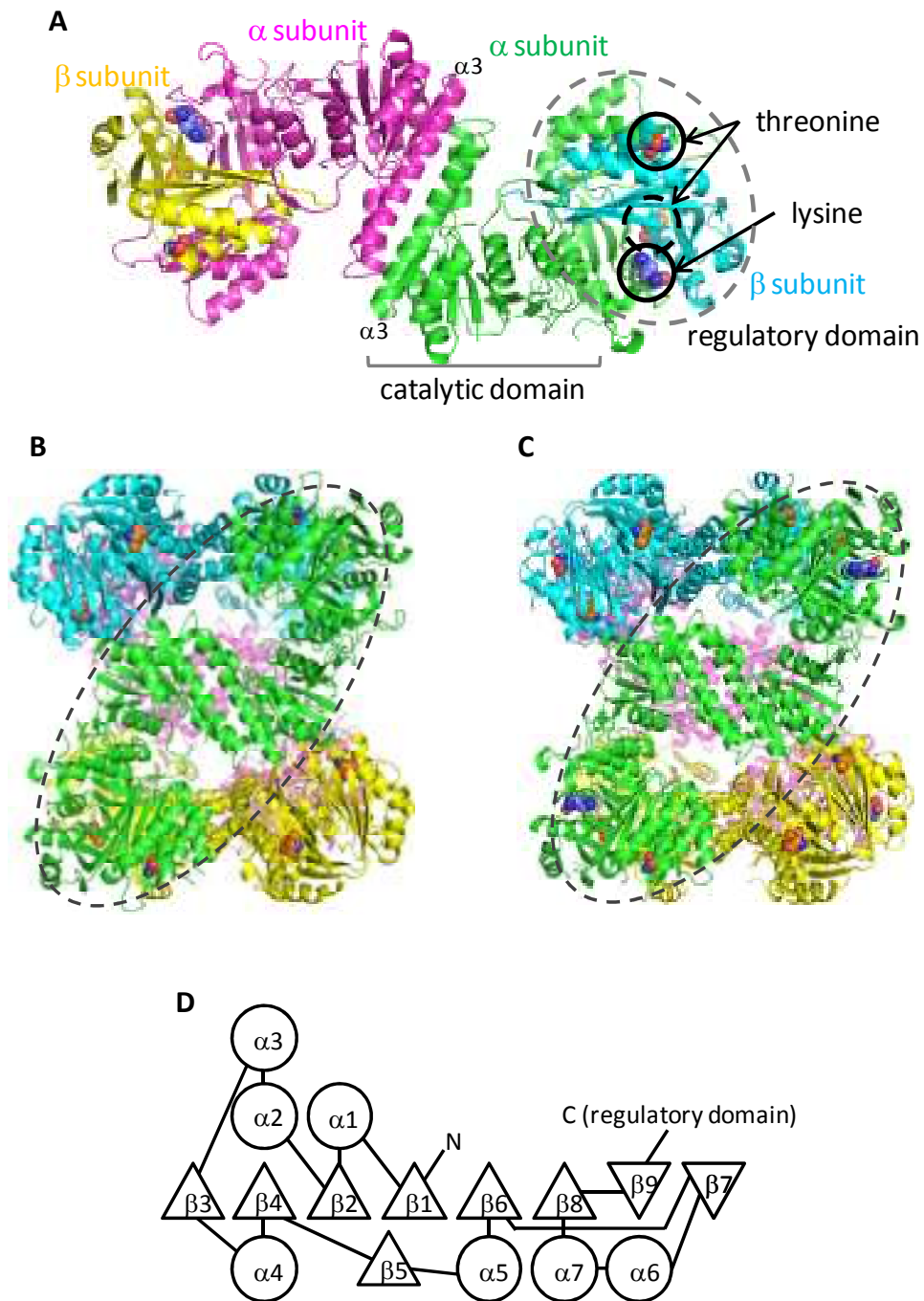


Figure 3-2 CgAK の全体構造

A. CgAK-T の全体構造 ( $\alpha$ サブユニットは緑 (chain A) とマゼンタ (chain C) で、 $\beta$ サブユニットはシアン (chain B) と黄色 (chain D) で示した。Thr と Lys はそれぞれオレンジと青の CPK モデルで示した。)

B, C. CgAK-R\* (B) と CgAK-S301F (C) の全体構造 ( $\alpha_2\beta_2$  ユニットごとに色分けし、1 つの  $\alpha_2\beta_2$  ユニートを点線で囲った。)

D. CgAK 触媒ドメインのトポロジー (○は helix を △は strand を示す)

在下において、 $\alpha_2\beta_2$  ヘテロテトラマーであることがゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定で示されており、これは Lys の有無では変わらないことから、CgAK の生理的なオリゴマー状態は  $\alpha_2\beta_2$  ヘテロテトラマーであると考えられる。本章で決定した結晶構造は Protein Data Bank に 3AAW、3AB2、3AB4(それぞれ CgAK-T、CgAK-R\*、CgAK-S301F)として登録した。

Table 3-1 データ収集及び構造精密化の統計値

Parameter	CgAK-T	CgAK-R*	CgAK-S301F
Data collection			
X-ray source	PF-BL6A	PF-BL5	PF-NW12
Wavelength (Å)	0.978	1.000	1.000
Space group	<i>I</i> 4	<i>P</i> 1	<i>P</i> 1
Unit cell dimensions			
<i>a</i> (Å)	162.2	101.8	99.03
<i>b</i> (Å)	162.2	119.1	112.9
<i>c</i> (Å)	133.9	124.4	120.0
$\alpha$ (°)	90	71.9	76.0
$\beta$ (°)	90	69.5	71.1
$\gamma$ (°)	90	72.7	74.5
Resolution (Å) <sup>a</sup>	2.50 (2.59-2.50)	2.59 (2.69-2.59)	2.47 (2.52-2.47)
Reflections (total/unique)	456,152/59,981	590,477/156,726	314,940/166,233
$R_{\text{sym}}$ (%) <sup>a</sup>	5.6 (33.8)	15.0 (47.0)	4.5 (36.3)
$I/\sigma(I)$ <sup>a</sup>	27.1 (5.8)	6.7 (0.84)	18.5 (1.6)
Completeness (%) <sup>a</sup>	99.8 (100.0)	98.2 (96.4)	96.3 (93.9)
Refinement			
Resolution (Å)	32.1-2.50	42.04-2.59	39.7-2.47
<i>R</i> factor/ <i>R</i> free (%)	21.0/25.1	23.2/28.0	22.3/28.8
No. of atoms			
Protein atoms	8,191	31,624	30,400
Threonine molecules	32	120	128
Lysine molecules	30		70
Water molecules	222	246	387
Average <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )			
Protein atoms	36.5	44.7	38.2
Threonine	38.2	41.8	30.6
Lysine	48.6		27.3
Water	34.7	34.3	30.6
Root mean square deviations of			
Bond length (Å)	0.008	0.006	0.009
Bond angle (°)	1.1	0.9	1.2
Ramachandran plot <sup>b</sup>			
Favored region	97.6	96.3	95.7
Allowed region	1.8	3.0	3.4
Outlier region	0.6	0.7	0.9
No. of NCS molecules <sup>c</sup>	2	8	8

<sup>a</sup>Values in parentheses are data for the highest resolution shell.

<sup>b</sup>Calculated using MolProbity.

<sup>c</sup>No. calculated  $\alpha\beta$  as a single unit.

### 3-3-2 エフェクター結合サイト

CgAK-T では $\alpha\beta$ ダイマーあたり 2 分子の Thr と 1 分子の Lys が活性制御ドメインに結合していた。Thr は第二章で示した活性制御ドメイン ( $\beta$ サブユニット)ダイマー (以後 $\beta_2$ ダイマーと呼ぶ) 中での結合位置と同様に、 $\alpha$ サブユニットの ACT1 (253-342) と  $\beta$ サブユニットの ACT2 (1-13, 94-160) との間と、 $\beta$ サブユニットの ACT1 (14-93) と  $\alpha$ サブユニットの ACT2 (250-262, 343-409) との間に構成される 2 つのエフェクター結合ユニットの site 1 に結合していた。 $\beta_2$ ダイマーでの様子と同じく、Thr のヒドロキシル基は Gln298(49)-N<sup>62</sup> (括弧内の番号は $\beta$ サブユニット中での残基番号) によって、アミノ基は Asp274(25)-O<sup>82</sup> によって認識されていた。さらに、Thr のカルボキシル基の酸素原子の近くにある 2 つの水分子を介した水素結合ネットワークや疎水性相互作用によって安定に結合していた (Fig. 3-3A, B)。

$\alpha\beta$ ダイマーあたり 2 つ存在するエフェクター結合ユニットの両方の site 1 に Thr が結合しているのに対し、Lys は 2 つあるエフェクター結合ユニットのうち、 $\beta$ サブユニットの ACT1 と  $\alpha$ サブユニットの ACT2 で構成されるエフェクター結合ユニットの site 2 にのみ結合していた (Fig. 3-3A)。Lys は site 1 に結合している Thr の結合様式と同様に 2 つのサブユニット間に結合していた (Fig. 3-3C)。Lys のカルボキシル基は Ile44( $\beta$ )-N、Val360( $\alpha$ )-N、Thr361( $\alpha$ )-N、Thr361( $\alpha$ )-O<sup>71</sup> (括弧内の $\alpha$ や $\beta$ はその残基が $\alpha$ サブユニット由来か $\beta$ サブユニット由来かを示す) によって安定化されていた。また、このカルボキシル基は Gly359( $\alpha$ )-N や Ile42( $\beta$ )-O と 2 つの水分子を介して水素結合を形成していた。Lys の $\alpha$ -アミノ基は Ile44( $\beta$ )-O と Met354( $\alpha$ )-O によって認識され、これは水分子を介しての Ile44( $\beta$ )-O、Met354( $\alpha$ )-O、Glu382( $\alpha$ )-O、Lys の $\varepsilon$ -アミノ基との水素結合ネットワークによって安定化されていた。この $\varepsilon$ -アミノ基は Asp45( $\beta$ )-O<sup>82</sup> とのイオン結合や Ser381( $\alpha$ )-O や Asp45( $\beta$ )-O さらに水分子との水素結合によって認識されていた。さらに、Lys 側鎖の炭素原子は Met354( $\alpha$ ) や Ile385( $\alpha$ )、Val360( $\alpha$ ) と疎水性相互作用していた。

Thr 結合サイト (site 1) では、Pro27( $\beta$ )-Gly28( $\beta$ ) 配列が  $\beta$ サブユニット中の helix  $\alpha 1$ ( $\beta$ ) の N 末に存在しており ( $\alpha$ サブユニットで対応する残基は Pro276( $\alpha$ )-Gly277( $\alpha$ ))、Thr のカルボキシル基を覆っている。同様に Pro358( $\alpha$ )-Gly359( $\alpha$ ) という配列が  $\alpha$ サブユニットの helix  $\alpha 10$  ( $\alpha$ ) の N 末に存在し、Lys のカルボキシル基を覆っている。Lys 結合と Thr 結合のどちらの場合においても、helix dipole の N 末の正電荷が、リガンドのアミノ酸のカルボキシル基の負電荷の認識に関与している。

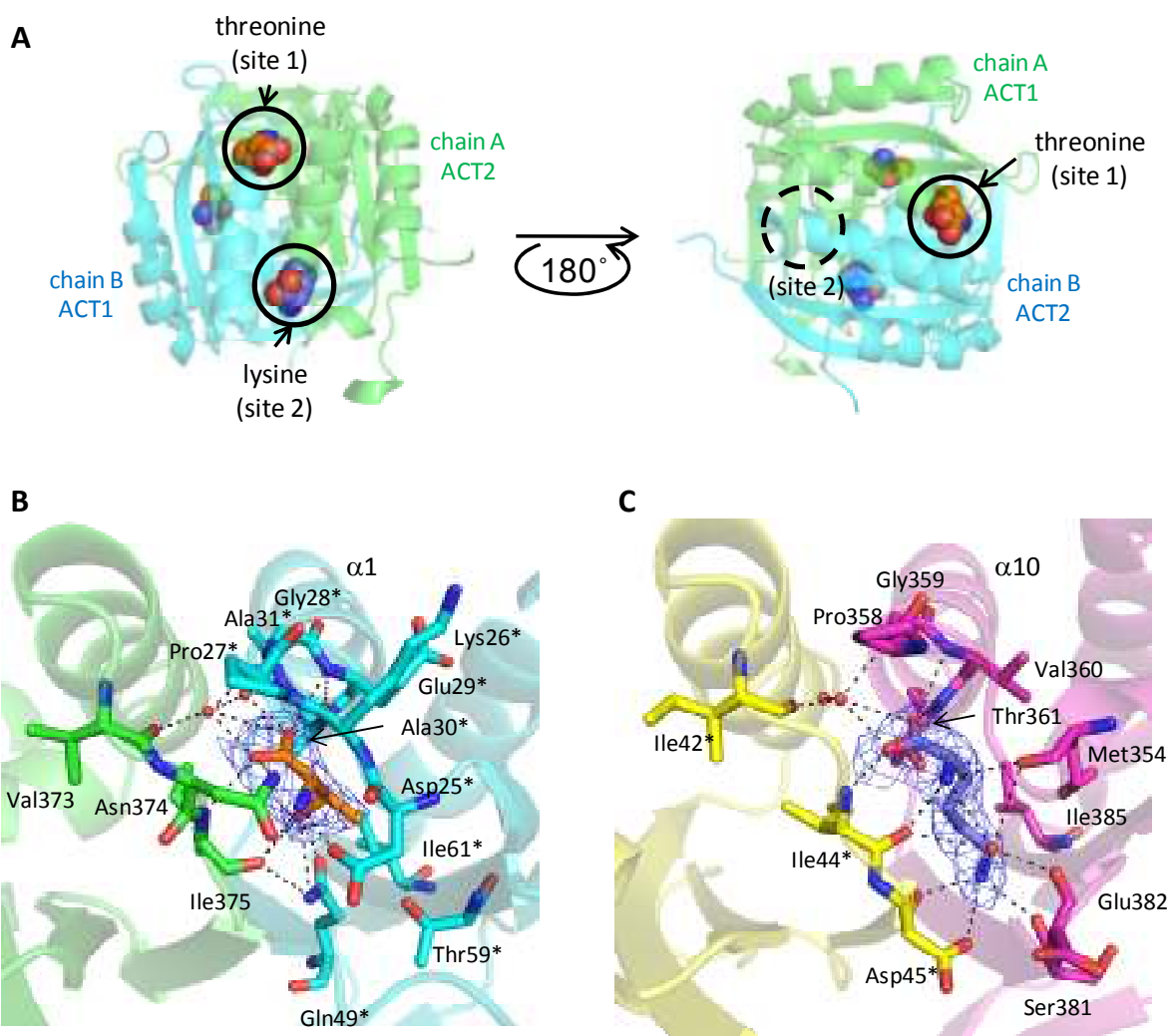


Figure 3-3 阻害剤結合サイト

- A. 活性制御ドメインダイマー中の阻害剤結合サイト(chain A ( $\alpha$ ) 由来の活性制御ドメインは緑で、chain B ( $\beta$ ) はシアンで示した。CPK モデルは Thr(オレンジ)と Lys(青))
- B. Thr 結合サイトと  $F_0-F_c$  マップ ( $3\sigma$ ) (緑; chain A ( $\alpha$ ), シアン; chain B ( $\beta$ ), オレンジ; Thr)
- C. Lys 結合サイトと  $F_0-F_c$  マップ ( $3\sigma$ ) (マゼンタ; chain C ( $\alpha$ ), 黄色; chain D ( $\beta$ ), 青; Lys)

### 3-3-3 Lys 結合に関わる残基の部位特異的変異体の解析

$\alpha\beta$ ダイマーあたり2つ存在するエフェクター結合ユニットのうち、 $\alpha$ サブユニットの ACT1 と  $\beta$ サブユニットの ACT2 で構成されるユニットの site 2 は活性中心に近いにもかかわらず何も結合していなかった (Fig. 3-3A)。CgAK-T の結晶構造で実際に Lys が結合していたのは活性中心から離れたエフェクター結合ユニットの site 2 であることから、この活性中心から遠い site 2 が実際に AK の活性制御に対して役割を持っているのかに興味を持たれた。そこで、Lys の  $\epsilon$ -アミノ基の認識に関わる Asp45( $\beta$ )及び、それに対応する $\alpha$ サブユニット中の残基である Asp294( $\alpha$ )を Ala に置換する変異体を作製し、それぞれの変異体における Lys による影響を調べた (Fig. 3-4A, B)。その結果、実際に結晶構造で Lys の結合に関与していた $\beta$ サブユニットの Asp45( $\beta$ )に変異を入れた D45( $\beta$ )A の変異を持つ変異体で、CgAK の Lys による阻害が解除された。一方で、 $\alpha$ サブユニットにのみ変異を持つ D294( $\alpha$ )A では野生型と同様に Lys による阻害が観察された。このことから、結晶構造で観察されているように、Lys は $\alpha$ サブユニット由来の ACT2 と  $\beta$ サブユニット由来の ACT1 で構成されるエフェクター結合ユニットの site 2 にのみ結合し、CgAK の活性制御に寄与していることが示された。

また、結晶構造での Lys が結合している site 2 と Lys の結合していない site 2 の周辺構造を比較したところ、Lys の結合したサイトでは Lys の結合に関わる Met354( $\alpha$ )-Thr361( $\alpha$ )の存在する loop  $\beta$ 15- $\alpha$ 10( $\alpha$ )が Lys の結合に適した位置に配置している一方で、空の site 2 ではこの loop に相当する loop  $\beta$ 6- $\alpha$ 3( $\beta$ )は Lys の結合する空間に向かって最大で 3 Å 程度内側に位置していた (Fig. 3-4C)。この結晶構造での様子からも活性中心により近い site 2 には Lys が結合しないことが分かる。

### 3-3-4 Asp 結合部位への Lys 結合

CgAK-T の構造では活性中心の Asp 結合部位に大きな電子密度が観察され、電子密度の形からそれは Asp ではなく Lys に由来すると考えられた (Fig. 3-5A)。CgAK-R\*の構造ではこのような電子密度は観察されなかった (Fig. 3-5C)。Lys が Asp 結合部位に結合していることから、Lys が活性中心から離れた活性制御ドメインダイマーに結合するアロステリック阻害剤としてだけでなく、基質の Asp と競合する阻害剤として働く可能性が示唆された。この仮説は Fig. 3-4 で示した変異体の Lys による影響の解析で、活性制御ドメインに結合した Lys を認識する残基である Asp45( $\beta$ )を Ala に置換した変異体で完全には Lys による阻害が解除されなかったことから支持される。CgAK-T の構造において、活性中心の Lys は水分

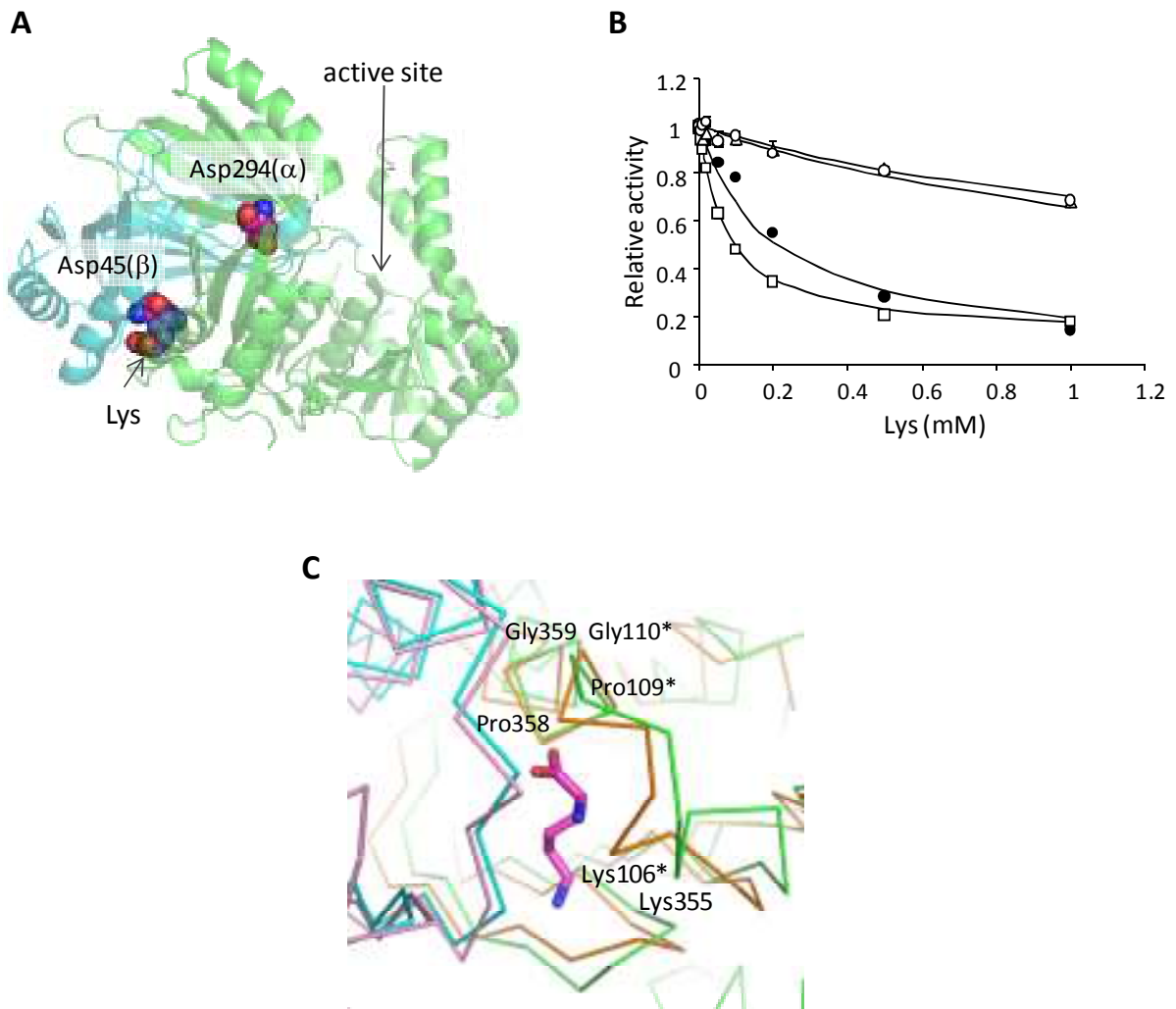


Figure 3-4 活性制御ドメインにおける Lys 結合

- A. 変異を導入した残基の位置。chain A ( $\alpha$ サブユニット)と chain B ( $\beta$ サブユニット)はそれぞれ緑とシアンで示す。変異を導入した Asp294( $\alpha$ )と Asp45( $\beta$ )をマゼンタ、結合した Lys を青の CPK モデルで示す。
- B. 各変異体の Lys による阻害プロファイル。  
 ●; 野生型 CgAK、○; D294( $\alpha$ )/D45( $\beta$ )A、□; D294( $\alpha$ )、△; D45( $\beta$ )
- C. Lys が結合している site 2 としていない site 2 の比較。Lys が結合しているサイトの  $\alpha$ サブユニットと  $\beta$ サブユニットをそれぞれ緑とシアンで、Lys が結合していないサイトの  $\beta$ サブユニットと  $\alpha$ サブユニットをそれぞれオレンジとピンクで示す。Lys はスティックモデル(マゼンタ)で示す。



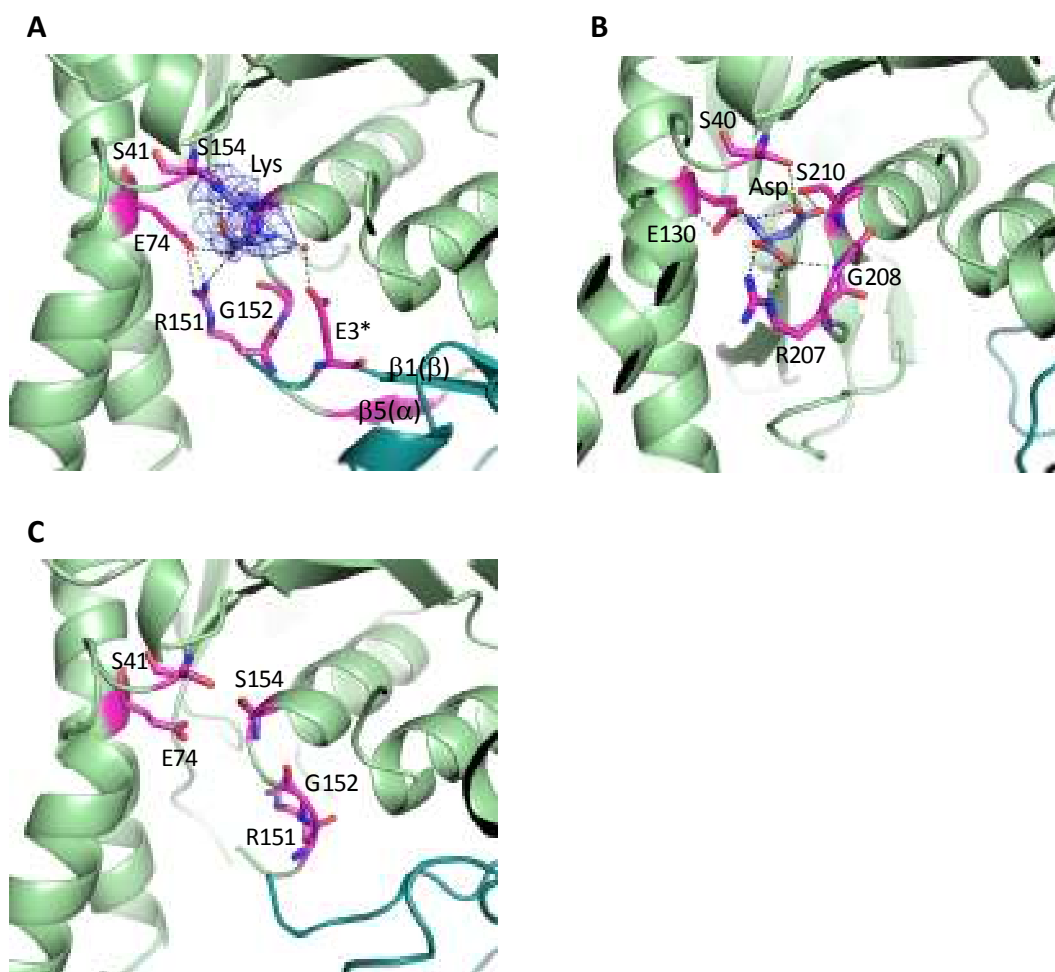


Figure 3-5 Asp 結合サイト

- A. CgAK-T の Asp 結合サイト。Asp 結合サイトに結合していた Lys の電子密度は  $F_o - F_c$  マップを  $3\sigma$  で書いたもの。
- B. MjAK の Asp 結合サイト
- C. CgAK-R における Asp 結合サイト  
結合していた Lys や Asp は青のスティックモデルで示し、その結合に関わる(とされる)残基をマゼンタで示した。

子を介して $\beta$ サブユニットのN末に存在するGlu3( $\beta$ )によって安定化されている。このGlu3( $\beta$ )のLysによる阻害への影響を調べるため、以下の3つの変異体について阻害を調べることにした。活性制御ドメインのLysの結合に関わる残基に変異を導入したD45( $\beta$ )A、活性中心のLysの結合に関わると予想されるGlu3( $\beta$ )をAlaに置換するE3( $\beta$ )A、そしてその両方の変異を持つ変異体である。10 mM Thr を常に反応溶液に入れた条件での活性測定の結果、D45( $\beta$ )A とE3( $\beta$ )A の両方を持つ変異体ではほぼ完全にLysによる影響が見られなくなり、E3( $\beta$ )A のみを持つ変異体では幾分か阻害が解除された (Fig. 3-6)。この結果から、CgAKの不活性型において、Lysが活性制御ドメインのみでなく活性中心のAsp結合サイトにも結合することが支持された。

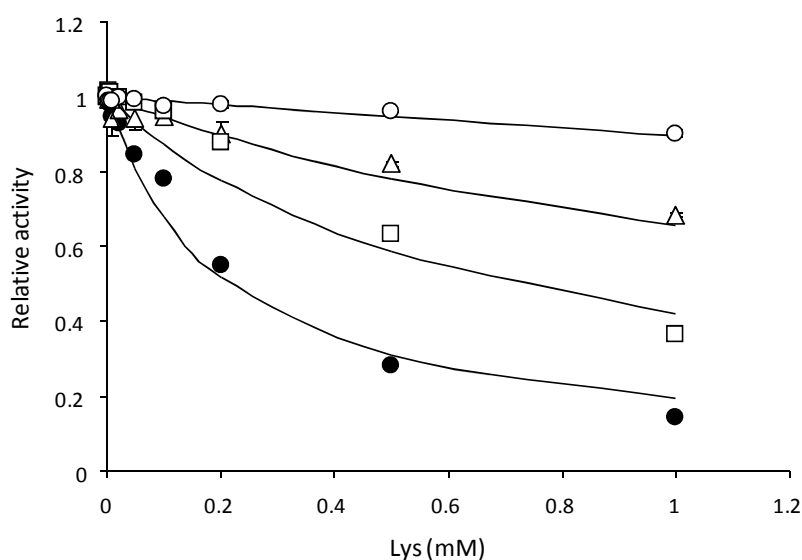


Figure 3-6 活性中心のリジン結合残基変異体のリジンによる阻害プロファイル  
 ●; 野生型 CgAK, □; E3( $\beta$ )A, △; D45( $\beta$ )A, ○; E3( $\beta$ )A/D45( $\beta$ )A

## 3-4 考察

### 3-4-1 ホモオリゴマー型 AK との四次構造の比較

$\alpha_2\beta_2$  型のヘテロオリゴマー型の AK もホモオリゴマー型の AK においても、その触媒ドメインは AAK family に特徴的な fold を取っているが、そのサブユニット間の相互作用に違いが見られた。EcAKIII などのホモオリゴマー型の AK では活性制御ドメイン同士でのみダイマーを形成しているが (Fig. 3-1)、 $\alpha_2\beta_2$  型の CgAK では  $\alpha$  サブユニットの触媒ドメイン同士の相互作用に加えて、 $\alpha$  サブユニットの活性制御ドメインと  $\beta$  サブユニットが相互作用していた。ホモオリゴマー型の AK と  $\alpha_2\beta_2$  型の AK の  $\alpha$  サブユニットの最も大きな違いは、ホモオリゴマー型 AK には CgAK の helix  $\alpha_2$  と  $\alpha_3$  の間に約 50 アミノ酸からなる 2 本の  $\alpha$  helix が挿入されていることである (Fig. 3-7A, B)。この 2 本の  $\alpha$  helix が CgAK には存在しないことで、主に  $\alpha_2$  と  $\alpha_3$  helix で構成される 3-helix bundle 様の構造によって  $\alpha$  サブユニット同士の相互作用が可能となっている。反対に、ホモオリゴマー型の AK ではこの 2 本の  $\alpha$  helix によって CgAK における相互作用面が覆われてしまうことで触媒ドメイン同士の相互作用が邪魔されてしまい、結果的に活性制御ドメイン同士の相互作用しか存在していないと考えられる。

また、最近報告されたシアノバクテリア (*Synechocystis*) 由来の AK (SyAK) では  $\alpha$  サブユニットのみからなるホモダイマー構造にもかかわらず、その dimer interface は触媒ドメイン間に形成されており、CgAK と同様の四次構造をとっていた (Fig. 3-7C) [57]。この SyAK では  $\alpha_2\beta_2$  型の AK と同様に helix  $\alpha_2$  と  $\alpha_3$  の間にホモオリゴマー型の AK で見られる 2 本の  $\alpha$  helix は存在しない。CgAK の  $\beta$  サブユニットに相当する 2 つの ACT ドメインが  $\alpha$  サブユニットの C 末に融合した型を取っており、結果として活性制御ドメインに 4 つの ACT ドメインを持つ (Fig. 3-7C)。このため活性制御ドメインは一つのポリペプチドに由来する 4 つの ACT ドメイン同士がエフェクター結合ユニットを形成し、さらには  $\alpha_2\beta_2$  型の CgAK のように helix  $\alpha_2$  や  $\alpha_3$  などで触媒ドメインでも相互作用をすることができる。このことから、EcAKIII や MjAK のようなホモオリゴマー型の AK で見られる 2 本の  $\alpha$  helix が触媒ドメイン同士の相互作用を邪魔していることが示唆される。

### 3-4-2 不活性型 CgAK-T と活性型 CgAK-R\* 及び CgAK-S301F の比較

Lys と Thr が結合した CgAK-T に加え、Thr のみが結合した CgAK-R\*、フィードバック阻害耐性変異体である CgAK の Ser301Phe 変異体の Lys、Thr が結合した CgAK-S301F の結晶

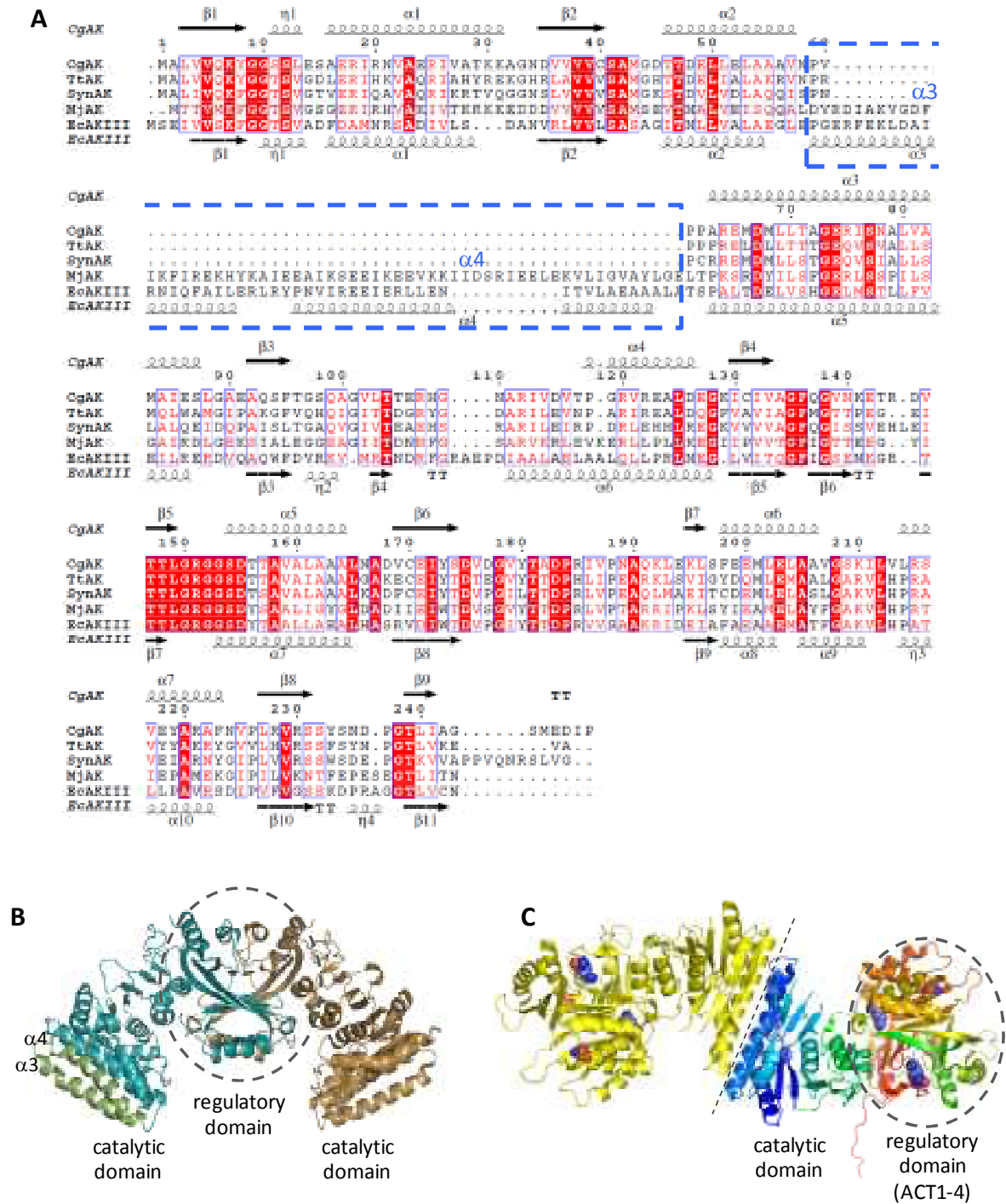


Figure 3-7 ホモオリゴマー型 AK との四次構造の比較

- A.  $\alpha_2\beta_2$  型 AK (CgAK と TtAK) とホモオリゴマー型の AK (MjAK と EcAKIII)、 $\alpha_2\beta_2$  型様の構造を持つホモオリゴマー型の AK (*Synechocystis* 由来 AK, SynAK) のアミノ酸配列アラインメント (ESPrict を用いて作製)
- B. ホモオリゴマー型 AK (EcAKIII)。chain A を青、chain B を茶色で示す。helix  $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$  を緑で示した。
- C. *Synechocystis* 由来の  $\alpha_2\beta_2$  様のホモオリゴマー型 AK。chain A を黄色で、chain B を rainbow で表した。C 末側に 4 つの ACT ドメインを持ち、活性制御ドメインを構成している。

構造を決定した。CgAK-T は結晶学的非対称単位に 1 つの $\alpha_2\beta_2$  単位を持つが、CgAK-R\* と CgAK-S301F では 4 つの $\alpha_2\beta_2$  単位が含まれていた。これらの結晶構造中に含まれる複数の $\alpha$ サブユニットの構造(CgAK-T では 2 つ、それ以外では 8 つ)を比較したところ、CgAK-T と CgAK-R\*ではその RMSD がそれぞれ 0.45 Å、0.45-0.98 Å となり、ほぼ同じ conformation を取っていることが分かる。一方で、CgAK-S301F における $\alpha$ サブユニット同士の比較ではその RMSD が 0.45-1.5 Å となり、その conformation にばらつきがあることが示された。これまでに活性型、阻害型の結晶が決定されている EcAKIII や MjAK では、open-closed の動きが活性制御に重要だということが示されている。そこで、CgAK のこれらの構造についても $\alpha$ サブユニットの dimer interface に存在する helix  $\alpha_3(\alpha)$ (残基番号 63-87)を固定し、比較した。CgAK-T と CgAK-R\*の $\alpha$ サブユニットを比較すると、CgAK-R\*の非対称単位中の全ての $\alpha$ サブユニットに比べて CgAK-T は閉じた構造をとっており、このことから CgAK において Thr と Lys の結合によって閉じた構造が安定化されることが示唆される(Fig. 3-8A)。また、CgAK-T と CgAK-S301F を比較すると CgAK-R\*と同様の開いた構造をとっているものもあれば、CgAK-T と同様の閉じた構造、またさらに閉じた構造というように様々な構造をとっていた(Fig. 3-8B)。このことから、Ser301Phe という変異によって Lys と Thr が結合しても閉じた構造を安定化できなくなり阻害耐性となることが示唆された。

### 3-4-3 Ser301Phe のフィードバック阻害耐性への効果

CgAK の Ser301Phe 変異体は Lys と Thr によるフィードバック阻害耐性を示す。第二章でも示したように、結晶構造からこの Ser301 は Thr 結合サイト近くに存在し、Lys や Thr の結合には直接関与していなかった。前項で示したように、CgAK-S301F では Lys と Thr が結合していても野生型で見られるような閉じた構造を安定化できず、それによりフィードバック阻害耐性となっていると考えられる。さらに、Ser301( $\alpha$ )を含む loop  $\beta_{12}(\alpha)$ - $\beta_{13}(\alpha)$ やそれに相当する $\beta$ サブユニットの Ser52( $\beta$ )を含む loop  $\beta_3(\beta)$ - $\beta_4(\beta)$ は非対称単位中の全ての $\alpha$ サブユニットと 4 つの $\beta$ サブユニット(chain B、D、F、J)において disorder していた。第四章で詳しく説明するが、Thr によって制御を受ける *T. thermophilus* 由来の AK の活性制御ドメインの Thr 非結合型の構造でもこの loop に相当する loop が disorder しており、この loop が活性制御に何らかの働きを持つと考えられている。しかし、これらの loop は活性中心からは離れた場所に存在することから、この loop の conformation 変化が直接接触媒活性を制御するとは考えにくい(Fig. 3-9A)。Ser301( $\alpha$ )/Ser52( $\beta$ )から Phe への置換によって Ser301( $\alpha$ )/Ser52( $\beta$ )と

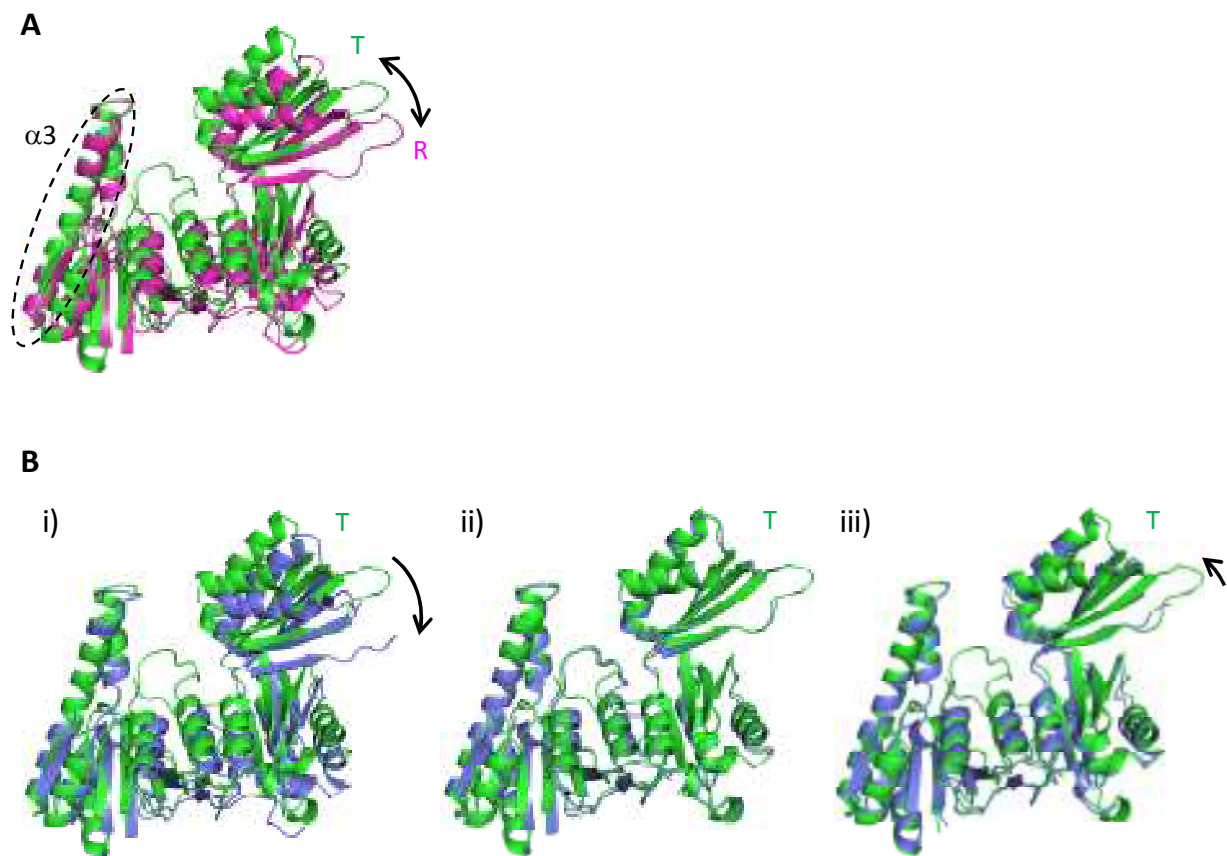


Figure 3-8 CgAK-T と CgAK-R\*、CgAK-S301F の構造比較

A. CgAK-T(緑)と CgAK-R\*(マゼンタ)の helix  $\alpha 3$  での重ね合わせ。

B. CgAK-T(緑)と CgAK-S301F(青)の重ね合わせ。

i) CgAK-R\*と同様の開いた構造(chain I)

ii) CgAK-Tと同様の閉じた構造(chain K)

iii) CgAK-T よりも閉じた構造(chain G)

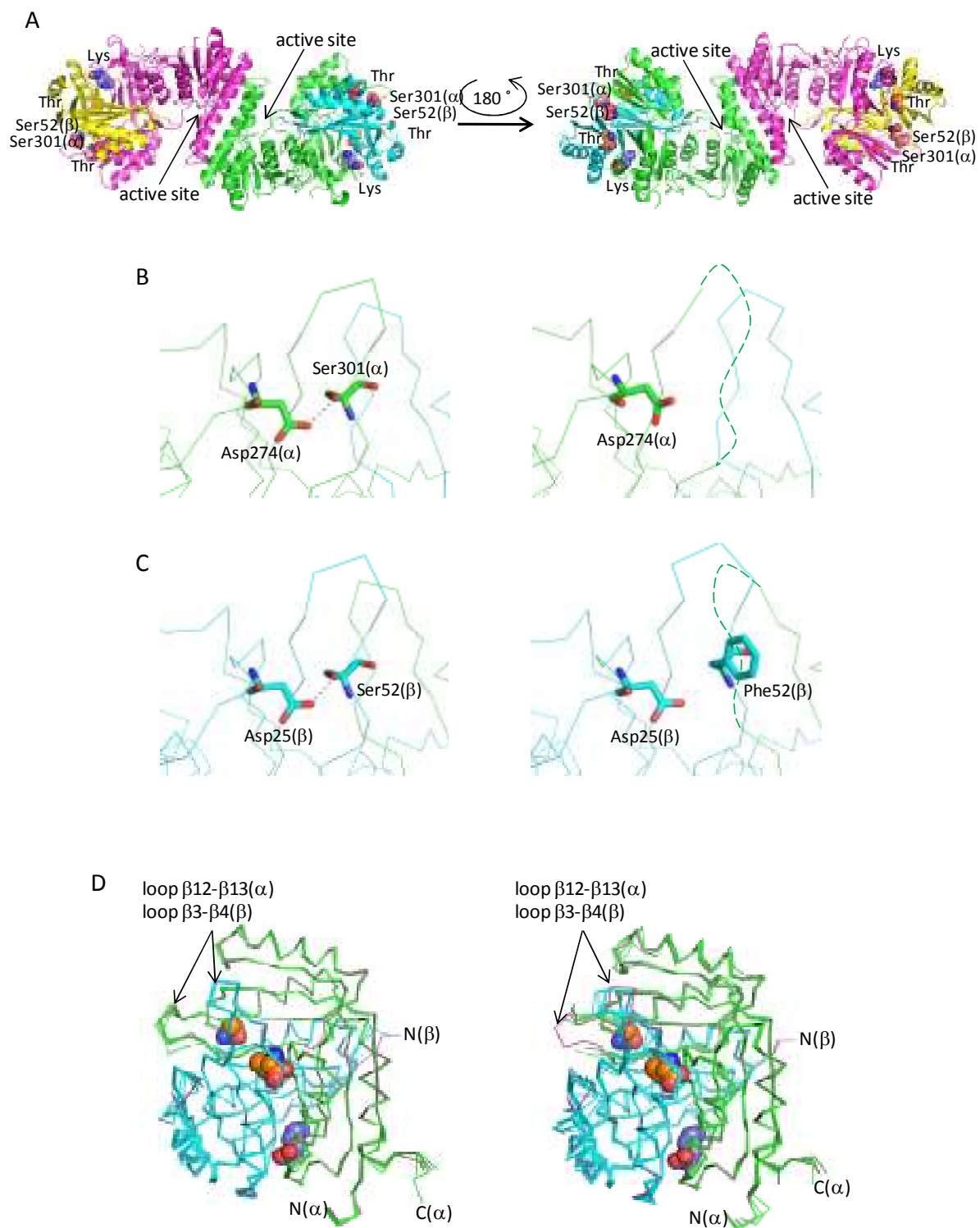


Figure 3-9 AEC 耐性変異 Ser301Phe

A. CgAK-Tにおける Ser301( $\alpha$ ), Ser52( $\beta$ )の位置。Ser301( $\alpha$ ), Ser52( $\beta$ ), Thr, Lys は CPK モデルで示した。

B. Ser301( $\alpha$ )の相互作用。左; CgAK-T の chain A。右; CgAK-S301F 中の chain O。

C. Ser52( $\beta$ )の相互作用。左; CgAK-T の chain B。右; CgAK-S301F 中の chain P。

D. 活性制御ドメインの重ね合わせ。左; CgAK-R\*と CgAK-T (マゼンタ)の重ね合わせ。右; CgAK-S301Fと CgAK-T の重ね合わせ

Asp274( $\alpha$ )/Asp25( $\beta$ )との水素結合は失われるが、Phe301( $\alpha$ )/Phe52( $\beta$ )を含む loop 以外は活性制御ドメイン中の水素結合ネットワークや構造の顕著な変化は見られなかった (Fig. 3-9B, C)。Ser301Phe 変異による活性制御への影響を結晶構造から詳細に明らかにすることはできなかったが、CgAK-S301F の $\alpha$ サブユニットの活性制御ドメインと $\beta$ サブユニットで形成される活性制御ドメインダイマーの構造は CgAK-R\*よりも可動性があり (Fig. 3-9D)、これが CgAK-S301F の全体構造の可動性と関連していると考えられる。

#### 3-4-4 CgAK とホモオリゴマー型の AK の比較

本研究を行っている間にいくつかのホモオリゴマー型の AK の結晶構造が決定された。その中でも *E. coli* 由来 AKIII や *M. jannaschii* 由来の AK では活性型と不活性型の構造が決定されている。EcAKIII では阻害剤である Lys の結合によって開いた構造をとり、さらにテトラマー構造をとるといわれている。この阻害型構造では活性制御ドメイン由来の loop が触媒ドメインを覆うように存在することで ATP 結合を阻害している。また、MjAK では阻害剤である Thr の結合した阻害型構造、基質 (アナログ) である Asp と AMPPNP が結合した活性型や Asp のみが結合した活性型構造が決定されている。これらの構造の比較から、Thr の結合によって MjAK が開いた構造を取ることが示されている。つまり、阻害剤結合による開いた構造の安定化はホモオリゴマー型の AK に共通のメカニズムであると考えられる (Fig. 3-10A)。対称的に、CgAK-T と CgAK-R\*の比較から、CgAK においては活性制御ドメインへの阻害剤の結合によって活性中心が閉じた構造が誘導されることが示された (Fig. 3-10B)。CgAK のような $\alpha_2\beta_2$ 型の AK では、異なるサブユニット由来の ACT1 と ACT2 が相互作用してエフェクター結合ユニットを形成しているが、ホモオリゴマー型の AK では異なるサブユニット由来の ACT1 同士、または ACT2 同士が相互作用している。この違いが阻害剤結合による構造変化の違いにつながるのではないかと考えられる。

#### 3-4-5 Lys 結合による構造変化およびそれによる活性制御機構

第二章で示した活性制御ドメインの Thr 結合によるダイマー化や CgAK-T と CgAK-R\*との構造比較から CgAK の阻害剤結合による構造変化は大まかに次の二段階に分けられる。1) Thr 結合による $\alpha$ サブユニットの活性制御ドメインと $\beta$ サブユニットのダイマー化。2) Lys 結合による活性制御ドメインと触媒ドメイン間の相互作用形成による閉じた構造の安定化。この Lys 結合によって生じる活性制御ドメインと触媒ドメインとの間の相互作用について述べる。



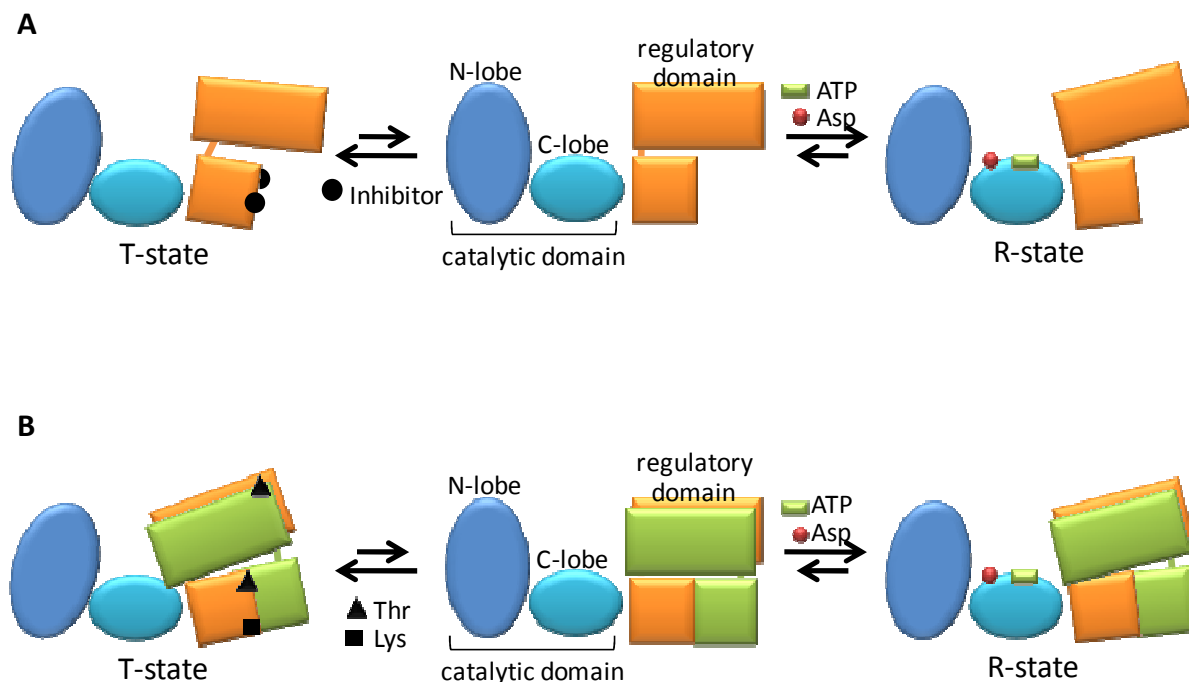


Figure 3-10 AKの活性制御機構におけるドメインの動き

A. ホモオリゴマー型のAK。モノマーのみを示す。

B. CgAK。αβサブユニットのみを示す。

活性制御ドメイン(βサブユニット)のThrのみが結合したβ<sub>2</sub>ダイマーの構造が決定されており(第二章参照)、CgAKはThrのみでは活性制御を受けないため、β<sub>2</sub>ダイマーは活性状態の活性制御ドメインダイマーを示していると考えられる。この構造ではC末端にACTドメインの構成には関わらないβ strand(strand β9)が存在しており、βサブユニットのN末のstrand β1とβ sheetを形成していた(Fig. 3-11A, C)。一方で、CgAK-TにおいてはこのC末のstrand β9に相当する電子密度はαサブユニットのC末及びβサブユニットのC末において観察されず、結晶構造中でdisorderしているようであった(Fig. 3-11B, D)。興味深いことに、CgAK-Tのβサブユニットではstrand β9(β)が位置していた場所に、触媒ドメイン由来のstrand β5(α)が位置し、βサブユニットN末のstrand β1(β)と相互作用していた(Fig. 3-11B)。MjAKのAsp結合型構造では、触媒ドメインのSer40やSer210がAspの側鎖カルボキシル基を認識し、Glu130がアミノ基を、Arg207やGly208が主鎖のカルボキシル基を認識している(Fig. 3-5B)。CgAKのstrand β5(α)のC末側にはこれらのAsp結合に関与する残基に相当するArg151(α)やGly152(α)、Ser154(α)が存在することから、この触媒ドメイン内の残基とβサブユニットの相互作用がAsp結合に影響を与える可能性が考えられた。実際に、CgAK-Tで

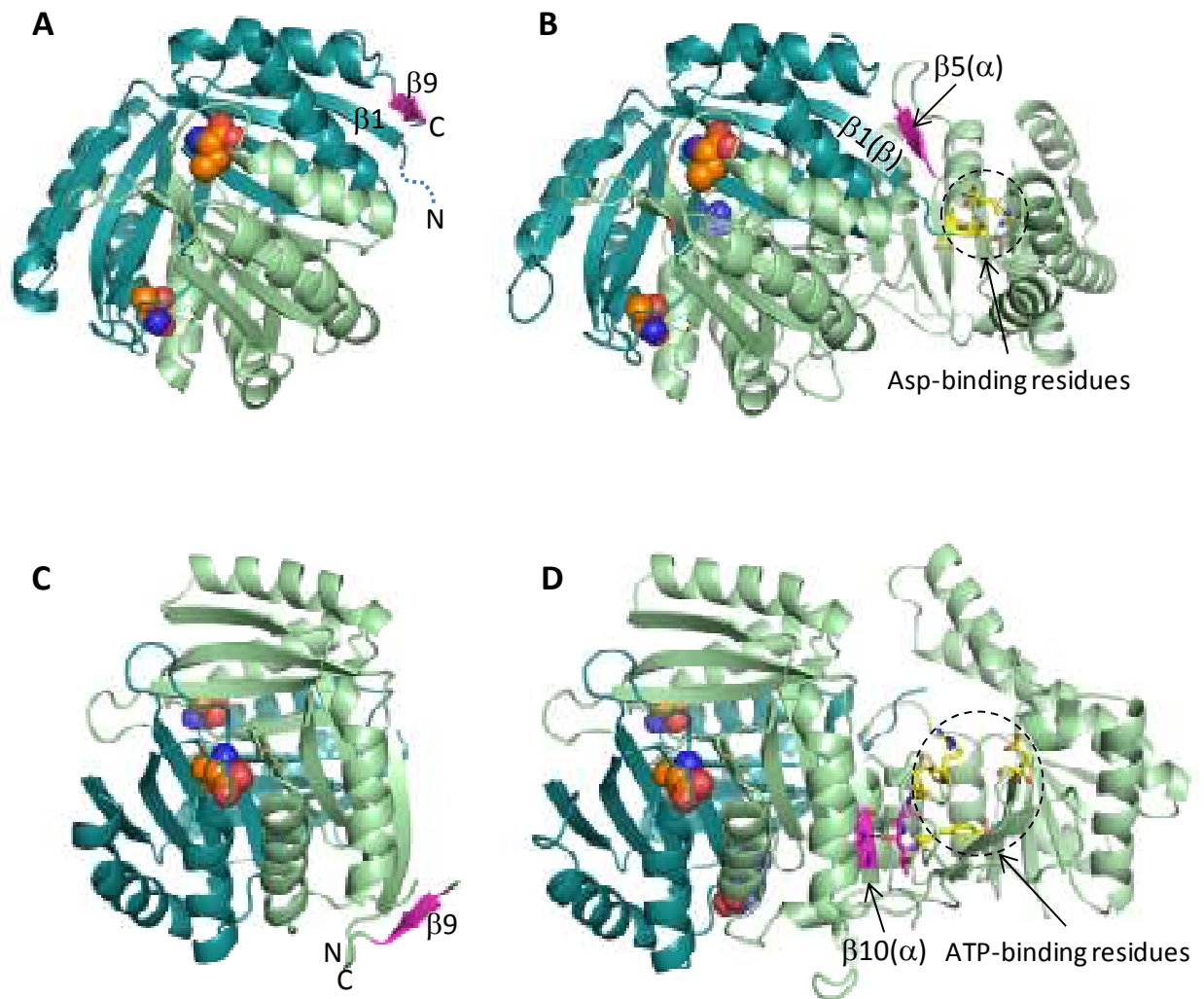


Figure 3-11 触媒ドメインと活性制御ドメイン(サブユニット)の相互作用

A, C. Thr 結合型 $\beta_2$ ダイマー構造。chain A を青緑、chain B を薄緑、strand  $\beta_9$  をマゼンタで示す。

B, D. CgAK-T。 $\alpha$ サブユニットを薄緑、 $\beta$ サブユニットを青緑、strand  $\beta_5(\alpha)$  をマゼンタで示す。黄色のスティックモデルは Asp または ATP 結合に関与する残基。Thr と Lys はそれぞれオレンジ、青の CPK モデルで示す。

はこの Arg151( $\alpha$ )は、同じく Asp 結合に関わる Glu74( $\alpha$ )とイオン結合を形成して閉じた不活性型構造の安定化に寄与しており、このイオン結合によって Asp の結合は阻害されると考えられた (Fig. 3-5A, B)。CgAK-R\*の構造中では、strand  $\beta$ 9( $\beta$ )と $\beta$ 5( $\alpha$ )はどちらも disorder しており観察されず、この Arg と Glu のイオン結合も見られなかった (Fig. 3-5C)。これらのことから、 $\beta$ サブユニットと触媒ドメインの相互作用やそれによる Arg151( $\alpha$ )と Glu74( $\alpha$ )のイオン結合により、Asp 結合が阻害されることが示唆される。また、前節で示したようにこの Arg と Glu のイオン結合の形成により Asp 結合が阻害されるばかりか、触媒ドメインとの相互作用によって  $\beta$ サブユニットの N 末が安定化され、活性中心内部へと入り込むことで、Asp の代わりに阻害剤である Lys が結合することが示唆される。ちなみに CgAK-S301F の構造においては、CgAK-Tと同様の閉じた構造をとっていた chain K や chain M では CgAK-Tと同様の strand  $\beta$ 5( $\alpha$ )と $\beta$ サブユニット N 末の strand  $\beta$ 1( $\beta$ )との  $\beta$  sheet 形成や Arg151( $\alpha$ )と Glu74( $\alpha$ )の静電相互作用が見られたものの、それ以外 chain では観察されなかったのに加えて、strand  $\beta$ 5( $\alpha$ )や strand  $\beta$ 9( $\beta$ )の電子密度も観察されなかった。

$\beta$ サブユニットの C 末と同様に、CgAK-Tにおいて $\alpha$ サブユニット内活性制御ドメインの ACT ドメインの構成には関わらない C 末の strand  $\beta$ 18( $\alpha$ )は観察されなかった。触媒ドメイン中の $\alpha$ サブユニットの活性制御ドメインの N 末の strand  $\beta$ 10( $\alpha$ )( $\beta$ サブユニットの strand  $\beta$ 1( $\beta$ )に相当する)に存在する Gly257( $\alpha$ )や Val258( $\alpha$ )は、触媒ドメインの loop  $\beta$ 6( $\alpha$ )- $\beta$ 7( $\alpha$ )上の Thr181( $\alpha$ )や Ala182( $\alpha$ )と水素結合を形成していた。この loop  $\beta$ 6( $\alpha$ )- $\beta$ 7( $\alpha$ )は ATP 結合に関わり、Lys は strand  $\beta$ 10( $\alpha$ )が構成因子となっているエフェクター結合ユニットに結合している。そのため、Lys 結合によるシグナルは strand  $\beta$ 10( $\alpha$ )やそれと相互作用している loop  $\beta$ 6( $\alpha$ )- $\beta$ 7( $\alpha$ )を介して ATP 結合部位へと伝達される可能性が示唆される。しかしながら、この相互作用は CgAK-R\*でも観察され、CgAK-T と CgAK-R\*との間でこの付近の構造に特に大きな違いが見られなかったことから、上述したような相互作用による Lys 結合シグナルの ATP 結合への影響が確実に存在するとは言いえない。 $\alpha$ サブユニット内の活性制御ドメインの活性制御への役割ははっきりとしなかったが、 $\alpha$ サブユニット内の活性制御ドメインと $\beta$ サブユニットではその触媒ドメインとの相互作用部位が異なることから、それらは同じアミノ酸配列で構成されるにもかかわらず、その活性制御における役割が異なることが示唆される。

#### 3-4-6 第三章のまとめ

第三章では CgAK の様々な状態での結晶構造を決定し、それらを第二章で示した Thr の

結合した $\beta_2$ ダイマーの構造を交えて比較を行うことで、長年の謎であったCgAKのLysとThrによる協奏阻害メカニズムを解明した。協奏阻害は活性制御ドメインへのThrの結合による活性制御ドメイン(サブユニット)のダイマー化と、活性制御ドメインへのLysの結合による閉じた構造の安定化の二段階に分けられる。このLysの活性制御ドメインへの結合によって $\alpha$ サブユニットの触媒ドメインと活性制御サブユニットである $\beta$ サブユニットの間に相互作用が生じ、閉じた構造が安定化されるとともに、Asp結合が阻害され、さらに代わりにLysがAspに対して競合的に結合することが示唆された。これら阻害剤結合のシグナルがどのようなルートを通して構造変化部位や活性中心に伝えられ活性制御が起こるのかというメカニズムは明らかになっていない。上述のようにLys結合が局所的な構造変化や大規模な構造変化を誘導することは示されたが、実際CgAK-TとCgAK-R\*の水素結合ネットワークやイオン結合の様子に目立った変化が見られなかった。このことは、活性型から阻害型への構造変化がわずかな自由エネルギーの差によって起こっていることを示唆しているのかもしれない。また、基質の結合した活性型構造の決定にも至っておらず、基質結合型の活性型構造が明らかになれば基質認識機構やより詳細な活性制御機構が明らかになると考えられる。さらには分子動力学のような手法を用いた解析やそれぞれの結晶構造中のアミノ酸残基同士の相互作用を網羅的に比較解析することで、アロステリックなリガンド結合シグナルの伝達機構を明らかにすることができるかもしれない。

## 第四章 *Thermus thermophilus* 由来のアスパラギン酸キナーゼの活性制御機構及び熱安定性の解析

### 4-1 背景と目的

第二章、第三章では CgAK のリジンとスレオニンによる協奏阻害機構について示した。高度好熱菌 *T. thermophilus* ではリジンを *C. glutamicum* のように DAP を経由して合成せず、 $\alpha$ -アミノアジピン酸 (AAA) を経由する新規リジン生合成経路で生産する。そのため、*T. thermophilus* 由来の AK (TtAK) はスレオニンとメチオニンの生合成にのみ利用され、TtAK はスレオニンによってフィードバック阻害を受ける。また、TtAK は CgAK と同じように  $\alpha_2\beta_2$  ヘテロテトラマー型の AK であり、互いに 47% のアミノ酸配列相同性を持つにもかかわらず、そのエフェクターは異なり、これらの制御機構の違いに興味を持たれる。

また、*T. thermophilus* は高度好熱性細菌であり、その至適生育温度の高さから細胞内のタンパク質も高い熱安定性を持つことが知られている。以前の当研究室における研究で、リジンによって制御を受ける *B. subtilis* 由来の AKII の触媒ドメインとスレオニンによって制御を受ける TtAK の活性制御ドメインを持つキメラ AK が、スレオニンによって制御を受けるようになるだけでなく、高い熱安定性を持つことが分かっている。このことから AK の活性制御ドメイン及び  $\beta$  サブユニットは阻害剤特異性を決定しているだけでなく AK の安定性にも寄与することが示唆されている[52]。発酵法や酵素法による物質生産系では、その反応の効率化のため、また冷却コストを抑えるため系の温度を高くすることを求められる場合も多い。このため、酵素の耐熱化は産業利用酵素の創製において重要なステップである。これまでに多くの高い熱安定性を持つタンパク質でその耐熱化機構が研究されているが、その要因は疎水性相互作用やイオン結合、水素結合、パッキングなど様々であり、個々のタンパク質で異なっている。

本章では *T. thermophilus* 由来の AK の活性制御ドメイン (サブユニット) の阻害剤であるスレオニンの結合型、非結合型の結晶構造を決定し、TtAK の活性制御機構の考察を行った。さらに、この TtAK 活性制御ドメインの結晶構造に加えて、第二章で述べた CgAK の活性制御ドメイン (サブユニット) の結晶構造に基づきそれらの熱安定性を比較し、その要因について考察した。

## 4-2 方法

### 4-2-1 菌株および試薬類

遺伝子操作に用いた試薬や培地などは第二章に記載したものと同一のものを用いた。

タンパク質発現に関しても同様だが、セレノメチオニン (SeMet) 置換体の組換えタンパク質の発現には *E. coli* B834(DE3) [ $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm met \lambda$ (DE3)]を用いた。

### 4-2-2 発現プラスミドの構築

結晶化及び熱安定性の解析に用いた *T. thermophilus* 由来の AK の $\beta$ サブユニット(以下 TtAK $\beta$ )の発現プラスミドは、pET26b(+)に TtAK $\beta$ 遺伝子を導入して作製した。当研究室において以前に作製された TtAK の遺伝子がクローニングされたプラスミド pAKT102 を鋳型として、以下に示すプライマーを用いて PCR により TtAK $\beta$ の遺伝子を増幅した。このプライマーを用いて PCR を行うことによって、TtAK $\beta$ の C 末端に(His)<sub>6</sub>タグが付加される。

5'-GGGGAATTCTCAAGGAGGTGTCATATGGAGATGGACAAGGCG-3'

5'-CCCAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGGCCTTGTCCAGCTC-3'

増幅した断片を pBluescript II SK(+)の MCS に *EcoRI/HindIII* サイトで導入し、塩基配列を確認後、このプラスミドを pBS-TtAK $\beta$ とした。その後、*NdeI/HindIII* で処理し、pET26b(+)の MCS に連結し、発現プラスミド pET-TtAK $\beta$ とした。

### 4-2-3 TtAK $\beta$ の発現、精製及び結晶化

TtAK $\beta$ の結晶化用サンプルは pET-TtAK $\beta$ を *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に導入した株を用いた大量発現により調製した。発現株を Kanamycin と Chloramphenicol を添加した 2×YT 培地で 37 °C で前培養し、培養液を 200 ml の上記培地の入った坂口フラスコに 1 % 植菌し、再び 37 °C で振盪培養した。菌体の OD<sub>600</sub> が 0.6 程度となった時点で IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、30 °C で引き続き 12-14 時間振盪培養を行った。培養後の菌体は遠心により回収し、Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5) で懸濁、洗浄し、Buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl) で再懸濁した。この菌体懸濁液を超音波破碎後、40,000 × g で遠心し、上清を粗抽出液とした。この粗抽出液をあらかじめ 20 mM Imidazole pH 7.5 を含んだ Buffer C で平衡化した His・Bind Resin, Ni-charged (Novagen) カラムに供し、Imidazole 濃度を 500 mM まで段階的に上昇させて目的タンパク質を溶出した。目的タンパ

ク質を含む画分を VIVASPIN (sartorius) を用いて濃縮し、これを Buffer C であらかじめ平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 カラムを素通りさせて精製サンプルとした。組換えタンパク質の精製度は 15 % SDS-PAGE により確認し、タンパク質濃度は Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて測定した。

また、SeMet 置換体のタンパク質の発現には *E. coli* のメチオニン要求株である B834(DE3) を宿主として行った。pET-TtAK $\beta$  で形質転換した B834(DE3) を、Kanamycin を含む 2 $\times$ YT 培地で 37 °C で前培養し、菌体を回収した。この菌体をあらかじめオートクレーブ滅菌した Se-Met core 培地 (Wako) で洗浄し、Se-Met core 培地、グルコース、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、Seleno-L-methionine、Vitamin 溶液を含む 200 ml の培地の入った坂口フラスコに 1 % 植菌し、再び 37 °C で OD<sub>600</sub> が 0.6 程度になるまで振盪培養を行った。終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、30 °C にて約 20 時間引き続き振盪培養した。菌体の回収から精製タンパク質の調製までの過程は SeMet で置換していない TtAK $\beta$  と同様に行った。

精製タンパク質は VIVASPIN を用いて濃縮し、10 mg/ml で結晶化に供した。結晶化は Hanging drop 蒸気拡散法を用いて 20 °C で行った。5 mM Thr を添加した条件と、添加していない条件の 2 条件で、Hampton Research のスクリーニングキットを用いた結晶化スクリーニングを行い、得られたいくつかの条件に対して結晶化条件の最適化を行った。その結果、5 mM Thr 添加条件では 0.1 M Sodium acetate pH 4.6、1.0-1.6 M NaCl の条件で、5 mM Thr 非添加条件では 0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.0、1.2-2.0 M NaCl の条件で結晶が得られた。また、SeMet 置換した TtAK $\beta$  でも同様の条件で結晶が得られた。

#### 4-2-4 TtAK $\beta$ の構造決定

X 線回折データ収集の前に、結晶をクライオプロテクタントとして 25 % (v/v) Glycerol を含むリザーバー溶液に移し、窒素ガスによって 95 K まで急速に冷やし、液体窒素の中で保存した。回折データの収集は Photon Factory の NW12 で行い、X 線の波長は SeMet 置換体の結晶を除き 1 Å とした。SeMet 置換体結晶は Se の XAFS を測定し、Peak 波長 (0.97920 Å)、Edge 波長 (0.97944 Å)、Remote 波長 (0.96300 Å) の 3 波長で回折データを測定した。反射イメージはビームラインに設置されている CCD カメラを用いて収集し、反射データはプログラム HKL2000[70] を用いて指数付け、積分、スケール処理を行った。

TtAK $\beta$  の 5 mM Thr を添加した条件で得られた結晶は空間群  $P4_32$  に属しており、格子定数は  $a = b = c = 141.8$  Å であった。TtAK $\beta$  とのアミノ酸配列相同性を 16 % 持ち、その当時まで

は ACT ドメインを持つタンパク質で立体構造既知のものの中で一番相同性の高かった Glycine cleavage system transcriptional repressor (PDB ID: 1U8S) をサーチモデルとして分子置換法を試みたが位相を決定することはできなかった。そこで、SeMet 置換体結晶を作製し多波長異常分散法 (MAD 法) での位相決定を目指した。SeMet 置換体結晶の X 線回折データを収集した結果、結晶の空間群は  $P4_32$  と決定されその格子定数は  $a = b = c = 141.4 \text{ \AA}$  であった。プログラム Solve[90] で Se サイトの同定と位相の決定、Resolve[91] にて初期モデルの構築を行った。このモデルをサーチモデルとして、Native 結晶の反射データに対して分子置換法を CCP4[71] のプログラム MOLREP[72] を用いて行い TtAK $\beta$  の Thr 結合型の結晶構造 (以下 TtAK $\beta$ -Thr) の初期構造を得た。電子密度図を用いたモデルの修正には XtalView[73] を用い、構造精密化には CNS1.1[74] を用いた。

また、Thr 非添加条件で得られた結晶は空間群  $P3_1$  に属し、その格子定数は  $a = b = 107.2 \text{ \AA}$ 、 $c = 87.22 \text{ \AA}$  であった。TtAK $\beta$  の Thr 非結合型の結晶構造 (以下 TtAK $\beta$ -Free) は TtAK $\beta$ -Thr の構造をモデルにした分子置換法で位相決定を行い、TtAK $\beta$ -Thr と同様に精密化を行った。タンパク質分子中の結合長や結合角の妥当性は PROCHECK[75] を用いて確認し、論文中の図は XtalView の XFIT、Raster 3D[76]、PyMOL[77] を用いて作製した。また、Thr 結合型と非結合型における回転角の計算には DynDom[92] を用いた。

#### 4-2-5 分子量測定

TtAK $\beta$  のサブユニット構成を超速心分析とゲルろ過クロマトグラフィーを用いて解析した。分子量測定のための TtAK $\beta$  の調整は結晶化のための調製と同様に行った。

沈降平衡法による分子量測定は  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  で行い、超速心機 Optima XL-A と An-50Ti rotor を用いて、 $280 \text{ nm}$  の波長でスキャンを行った。Buffer C または Buffer C に  $5 \text{ mM}$  Thr を添加したバッファーで、3つの異なる濃度 ( $A_{280}$  が  $0.125$ ,  $0.25$ ,  $0.5$ ) に調製した TtAK $\beta$  を six-channel centerpiece に注入した。サンプルは  $9,757$ ,  $20,644$ , そして  $35,562 \text{ g}$  で回転させた。データフィッティングには 9 つのカーブを利用し、Beckman 社により提供されている ORIGIN に組み込まれたソフトウェアによって非線形最小二乗法で解析を行った。解析に用いた TtAK $\beta$  の偏比容は SEDNTERP[93] というソフトウェアによって  $0.747 \text{ cm}^3/\text{g}$  と見積もられた。

ゲルろ過クロマトグラフィーによる TtAK $\beta$  の分子量測定は第二章で示した CgAK $\beta$  の分子量測定と同様の方法で行った。さらに、TtAK の  $\alpha_2\beta_2$  全長での  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットの Thr 存在、非存在下での相互作用の様子もゲルろ過クロマトグラフィーを用いて調べた。



TtAK は以前に当研究室で作製された、pUC18 の *EcoRI/XbaI* サイトに TtAK の $\alpha$ サブユニット、*XbaI/SphI* サイトに C 末端に(His)<sub>6</sub> タグが付加された $\beta$ サブユニットが潤に挿入されたプラスミド pAKT102his を用いて、*E. coli* の AK 欠損株である GT3 を形質転換した株を用いて大量発現した。この発現株を、Ampicillin を含む 2×YT 培地で 37 °C にて前培養し、この培養液を同様の培地を 200 ml の入った坂口フラスコに 1 %植菌し、引き続き 37 °C で振盪培養した。菌体の OD<sub>600</sub> が 0.6 程度となったら終濃度 1 mM の IPTG を添加し、再び 37 °C で 12-14 時間振盪培養した。菌体の回収から目的タンパク質の精製は TtAK $\beta$ とほぼ同様の方法で行ったが、超音波破碎、遠心後の上清を 70 °C で 30 分間処理することで粗抽出液とした。TtAK は 5 mg に調製し、Buffer C または 5 mM Thr を含む Buffer C によってあらかじめ平衡化された HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) に供した。カラムから溶出してくる TtAK のサンプルは 125 ml から 225 ml まで 2.5 ml ずつ回収し、SDS-PAGE に供した。また、SDS-PAGE でのバンド強度の解析には ImageJ[94]を用いた。

#### 4-2-6 変異体の調製及び活性測定

TtAK の部位特異的変異体の発現プラスミドは以下のように作製した。上述した TtAK の発現プラスミドである pAKT102his を基に作製し、 $\alpha$ サブユニット部分と $\beta$ サブユニット部分をそれぞれ *EcoRI/XbaI*、*XbaI/SphI* で切り出し、pUC18 に連結した。それぞれを鋳型にして、以下に示すプライマーを用いて Quik-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) により目的の変異を導入し、塩基配列を確認した。その後、それぞれを pUC18 に戻し、 $\alpha$ サブユニットにのみ変異を持つもの、 $\beta$ サブユニットにのみ持つもの、そして両サブユニットに変異を持つものの発現プラスミドを作製した。

TtAKQ294( $\alpha$ )/50( $\beta$ )-FW: 5'-GACATGATCATCGCGGGGGTTCCCGGCCAC-3'

TtAKQ294( $\alpha$ )/50( $\beta$ )-RV: 5'-GTGGCCGGGAACCCCGCGATGATCATGTC-3'

この TtAK の変異体の発現は上記の TtAK の野生型と同様に行ったが、Ni アフィニティー精製の後ゲルろ過クロマトグラフィーには供さず活性測定を行った。活性測定法は基本的には第二章と同じ方法で行ったが、Thr に対する感受性を評価するため Thr の濃度を適宜調節して測定した。

#### 4-2-7 CgAK $\beta$ 及び TtAK $\beta$ の熱安定性解析用サンプルの調製

TtAK $\beta$ とCgAK $\beta$ の温度変化による変性過程を CD スペクトルや DSC (示差走査型熱量計)

を用いて測定した。熱安定性の解析に用いた TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ は基本的にこれまでに述べてきた方法と同様に調製した。pET-TtAK $\beta$ または pET-CgAK $\beta$ で形質転換された *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を用いて大量発現を行った。菌体を回収し、Buffer A での洗浄、Buffer C での再懸濁を行い、菌体を超音波破碎した。Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、精製サンプルを HiLoad 26/60 Superdex 75 カラムに供した。ゲルろ過クロマトグラフィーの際のバッファーは CD スペクトル用では Buffer C を用い、DSC 測定用のサンプル調製では Buffer F (20 mM Na•K phosphate) を用いた。CD スペクトル測定用サンプルは Buffer G (10 mM Na•K phosphate) に対して透析を行い最終サンプルとした。それぞれのサンプルを適宜濃縮し、濃度測定を行った。

#### 4-2-8 CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は JASCO J-720 Spectropolarimeter (日本分光)、PTC-343 型ペルチェ式温度制御装置 (日本分光) を用いた。まず、標準測定によりタンパク質濃度や感度などのパラメータを決定した。その結果、タンパク質濃度は 40  $\mu\text{g/ml}$ 、感度 50 mdeg、レスポンス 0.5 sec と決められた。実際の温度変化測定では 25-95  $^{\circ}\text{C}$  での 222 nm の吸光を測定し、温度変化の速度は 60  $^{\circ}\text{C/h}$  とした。基本的に Buffer G を溶媒として用いたが、5 mM Thr を加えての測定も行った。

$T_m$  (融点) の算出は、以下のようにして行った。変性状態のタンパク質量[D]と非変性状態のタンパク質量[N]の各温度における比から非変性状態から変性状態になるために必要な自由エネルギー ( $\Delta G$ ) が見積もられ、この  $\Delta G$  が 0 となるときの温度が  $T_m$  である。つまり、

$$[D] = (y - y_N) / (y_D - y_N)$$

$$[N] = (y_D - y) / (y_D - y_N) \text{ より、}$$

$$\Delta G = -RT \ln([D] / [N]) = -RT \ln(y - y_N) / (y_D - y) \text{ となる。}$$

これにより、温度と  $\Delta G$  は直線の関係となるので、 $\Delta G$  が 0 となる温度を算出して  $T_m$  とした。(y は CD 測定値を示し、 $y_D$  は変性状態、 $y_N$  は非変性状態の CD 測定値を示す。)

#### 4-2-9 DSC 測定

DSC (示差走査型熱量計) による変性温度の測定には VP-DSC MicroCalorimeter (MicroCal) を用いた。溶媒には Buffer F を用い、5 mM Thr や 5 mM Lys を必要に応じて添加した。変性に伴い凝集が起こってしまうと測定ができなくなるので、比較的低いタンパク質

濃度で測定を行い、TtAK $\beta$ の Thr 非添加条件では 0.2 mg/ml、Thr 添加条件は 0.1 mg/ml で測定し、CgAK $\beta$ は全ての条件で 0.2 mg/ml で測定を行った。昇温速度は 60 °C/hour とした。変性温度の解析には Origin の中に組み込まれた MicroCal 社により提供されている解析プログラムを用いた。

#### 4-2-10 各安定化因子の定量化

TtAK $\beta$ -Thr、CgAK $\beta$ の結晶構造から、タンパク質の安定化に寄与するといわれている因子の定量化を行った。タンパク質内部のキャビティの計算にはプログラム VOIDOO[95]を、水素結合の解析にはプログラム HBPLUS[96]を用いた。非変性状態と変性状態の表面積から求められる自由エネルギー変化はプログラム asc[97]を用いて計算した。このときに用いた変性状態のモデルは Insight II を用いて作製し、自由エネルギーを算出するための係数は Eisenberg と McLachlan[98]の係数を用いた。変性状態と非変性状態の表面積から求められる自由エネルギー変化については

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G &= (\Delta G_{CgFold} - \Delta G_{TtFold}) - (\Delta G_{CgUnfold} - \Delta G_{TtUnfold}) \\ &= (\Delta G_{TtUnfold} - \Delta G_{TtFold}) - (\Delta G_{CgUnfold} - \Delta G_{CgFold})\end{aligned}$$

を用いて算出した。

また、TtAK $\beta$ -Thr と CgAK $\beta$ の断面図は Chimera[99]を用いて作製した。

## 4-3 結果

### 4-3-1 TtAK $\beta$ の結晶構造

TtAK $\beta$ の Thr を添加した条件での結晶化に成功し、2.15 Å 分解能で X 線回折データを取得できた。SeMet 置換体の結晶から収集した Se の異常分散データを用いた MAD 法によって位相決定を行い、構造決定に成功した。TtAK $\beta$ -Thr の結晶中にはその結晶学的非対称単位に 1 分子の TtAK $\beta$ のダイマー構造と 2 分子の Thr、結晶化バッファー由来の酢酸が 2 分子、さらに 153 の水分子が含まれていた (Fig. 4-1A)。N 末端の一部 (1-4) や C 末端の一部 (158-161) の電子密度は観察されず、disorder していた。PROCHECK[75]による Ramachandran plot では 95.4 %の残基が Most favored regions に、4.6 %の残基が Additionally allowed regions に分類されていた。

また、Thr 非添加条件で TtAK $\beta$ の結晶からは 2.98 Å 分解能のデータが得られ、TtAK $\beta$ -Thr の構造をモデルとした分子置換法により構造決定を行った。TtAK $\beta$ -Free の結晶中には、非対称単位に 3 つのダイマー構造 (それぞれ chain AB、CD、EF で構成される) と 79 の水分子が含まれていた (Fig. 4-2A)。TtAK $\beta$ -Thr と同様に N 末 (chain A: 1-4、chain B と C: 1-4、chain D から E: 1-5) と C 末 (chain A と C から F: 158-161、chain B: 159-161) の残基の電子密度が観察されなかった。さらに、どの chain においても loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 の一部のアミノ酸残基 (chain A と D: 54-56、chain B: 53-59、chain C: 55-56、chain E: 56-57、chain F: 53-56) が観察されなかった。PROCHECK ではそのジオメトリーは 89.0 %が Most favored regions、10.0 %が Allowed regions、0.7%が Generously allowed regions、0.3 %が Disallowed regions に分類された。X 線回折データと精密化の統計値は Table 4-1 に示す。また、これらの結晶構造は Protein Data Bank に PDB ID; 2DT9、2ZHO (それぞれ TtAK $\beta$ -Thr、TtAK $\beta$ -free) として登録した。

TtAK $\beta$ -Thr はホモダイマー構造をとっており (Fig. 4-1A)、これは $\alpha_2\beta_2$ 型の TtAK の $\alpha$ サブユニット由来の活性制御ドメインと $\beta$ サブユニットによる活性制御ドメインダイマーの構造に相当する。2 つのサブユニット間の RMSD は 0.50 Å であり、よく似ていたが、特に構造の違いがみられる部分は 84-88、94-95、102-104 であった (Fig. 4-1B)。TtAK $\beta$ のそれぞれのサブユニットは 2 つの ACT ドメインが存在し、CgAK $\beta$ でも見られたように N 末側の ACT1 は連続したポリペプチド鎖によって構成されているが、C 末側の ACT2 は ACT1 の直後に存在する  $\beta\alpha\beta\alpha$  と ACT1 の前に存在する  $\beta$  strand で構成されていた。また、CgAK $\beta$ と同様に異なる

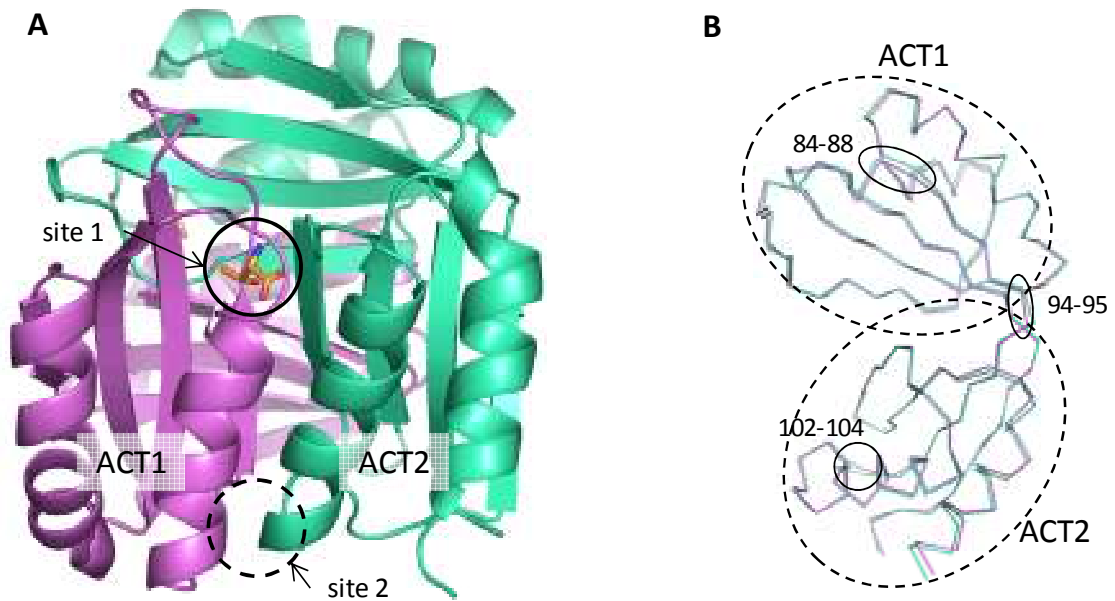


Figure 4-1 TtAK $\beta$ -Thr の全体構造

- A. TtAK $\beta$ -Thr のダイマー構造。chain A は紫、chain B は緑で示した。オレンジのスティックモデルは Thr を示す。
- B. ダイマー構造中の 2 つのモノマーの重ね合わせ。ACT ドメインの単位を点線で囲った。特に構造に違いが見られた部分は丸で囲った。

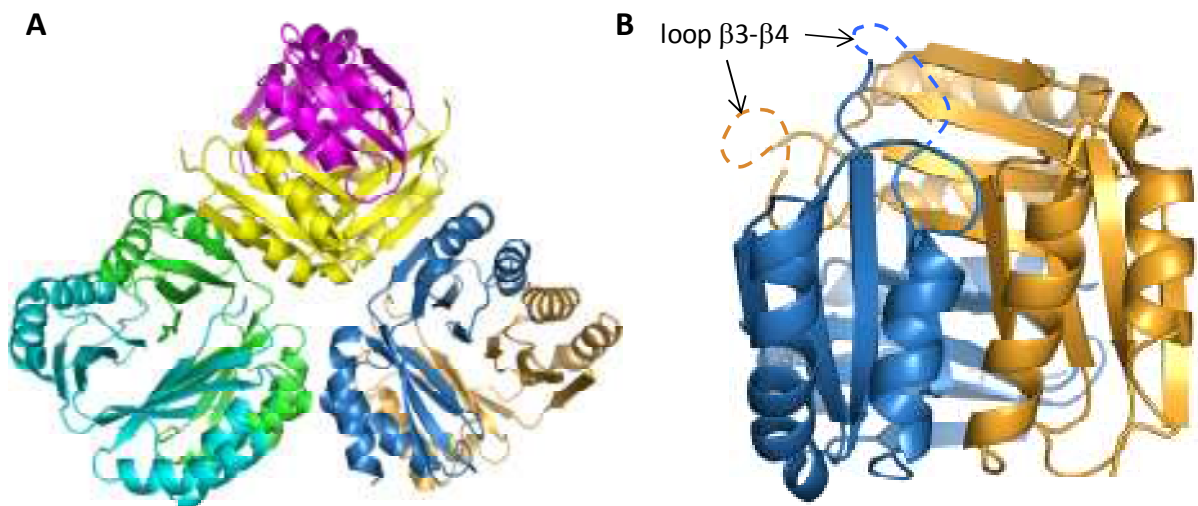


Figure 4-2 TtAK $\beta$ -free の全体構造

- A. 結晶学的非対称単位中の構造。chain A; マゼンタ、chain B; 黄色、chain C; シアン、chain D; 緑、chain E オレンジ、chain F; 青
- B. chain EF で構成されるダイマー構造。disorder していた loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 を点線で示した。

Table 4-1 X線回折データ収集及び精密化統計値

	SeMet-TtAK $\beta$ -Thr			Native	
	Peak	Edge	Remote	TtAK $\beta$ -Thr	TtAK $\beta$ -free
Data collection <sup>a</sup>					
X-ray source		PF-NW12		PF-NW12	PF-NW12
Wavelength (Å)	0.9792	0.9794	0.9630	1.000	1.000
Space group		<i>P</i> 4 <sub>3</sub> 32		<i>P</i> 4 <sub>3</sub> 32	<i>P</i> 3 <sub>1</sub>
Cell dimensions		<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> = 141.4		<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> = 141.8	<i>a</i> = <i>b</i> = 107.2 <i>c</i> = 87.2
Resolution (Å)		2.40 (2.49-2.40)		2.15 (2.19-2.15)	2.98 (3.09-2.98)
Reflections (total/unique)	364163/19507	365251/19539	364474/19539	578149/27145	133032/22878
<i>R</i> <sub>sym</sub> <sup>b</sup> (%)	9.5 (46.5)	9.5 (46.3)	9.7 (51.5)	6.7 (33.2)	9.2 (37.1)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	30.8 (6.0)	30.2 (5.8)	29.5 (5.5)	59.9 (11.1)	21.0 (3.2)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	99.8 (100.0)
Phasing					
Number of Se sites		8			
FOM <sup>c</sup>		0.40			
Refinement					
Resolution (Å)				47.2-2.15	46.5-2.98
<i>R</i> -factor <sup>d</sup> (work/test) (%)				18.8/22.6	24.4/26.6
Number of atoms				2405	6545
Protein atoms				2228	6466
Thr molecules				2	
Acetate molecules				2	
Water molecules				153	79
Average B-factor					
Protein atoms				32.9	56.3
Thr				23.3	
Water				34.8	44.4
rmsd values					
Bond length (Å)				0.009	0.010
Bond angle (°)				1.50	1.40
Ramachandran plot <sup>e</sup>					
Most favored (%)				95.4	89.0
Additionally favored (%)				4.6	10.0
Generously allowed (%)				0	0.7
Disallowed (%)				0	0.3

<sup>a</sup> Values in parentheses are data for the highest resolution shell.<sup>b</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ <sup>c</sup> Figure of merit was calculated with SOLVE program.<sup>d</sup>  $R\text{-factor} = \sum_{\text{hkl}} | |F_o| - |F_c| | / \sum_{\text{hkl}} |F_o|$ <sup>e</sup> Calculated using PROCHECK.

サブユニット由来の ACT1 と ACT2 が隣り合って相互作用し、エフェクター (Thr) 結合ユニットを形成していた。また、1つのサブユニット内の ACT1 と ACT2 が垂直になるように配置されているので、エフェクター結合ユニットの 8本の $\beta$  strand で構成される逆平行 $\beta$  sheet が向かい合ってダイマーを形成している。ホモオリゴマー型の AK では異なるサブユニットの等価な ACT ドメインが相互作用してエフェクター結合ユニットを形成していることから、TtAK $\beta$  や CgAK $\beta$  で見られるこの特徴的なダイマー構成は、 $\alpha_2\beta_2$  型の AK に限られたものだといえる。

以下に詳しく述べるが、TtAK $\beta$ は Thr がない状態ではゲルろ過クロマトグラフィーではモノマーと考えられる位置に溶出するが、TtAK $\beta$ -Free の構造もホモダイマーであった (Fig. 4-2B)。これは結晶化に使用したタンパク質濃度が高濃度であったからだと考えられる。TtAK $\beta$ -Thr と同様のサブユニット相互作用によってダイマーを形成しており、TtAK $\beta$ -Thr との主な違いは loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 領域に存在していた。

#### 4-3-2 Thr 結合サイト

TtAK $\beta$ -Thr の構造中では異なるサブユニット由来の ACT1 と ACT2 で構成されるエフェクター結合ユニットの site 1 に Thr の電子密度が観察された (Fig. 4-3A, B)。Thr は CgAK $\beta$ での Thr 結合サイトと同様に2つのサブユニットからの多くの残基との相互作用によって安定に結合していた。Thr の $\alpha$ -アミノ基は Asp26-O <sup>$\delta$ 2</sup>とイオン結合や Asn125\*-O <sup>$\delta$ 1</sup>、Ile126\*-O (残基番号の後のアスタリスクは別のサブユニット由来の残基ということを示す)との間に水素結合を形成していた。また、Thr の側鎖のヒドロキシル基は Gln50-O <sup>$\epsilon$ 1</sup> や Ile26\*-O と水素結合を形成し、メチル基は Ile24、Ile30、Met62 の側鎖と疎水性相互作用により安定化されていた。2つの水分子が Thr のカルボキシル基の2つの酸素原子の近くに存在し、Gly29-N、Ala31-N、Ala32-N、そして Phe116\*-O との水素結合ネットワークに寄与していた。TtAK $\beta$ -free における Thr 結合サイトでは、Thr の $\alpha$ -アミノ基の認識に関わる Gln50 の側鎖が Thr サイトから離れた方向を向いていた。さらに、Ile24 や Asp26 が位置する loop  $\beta$ 2- $\alpha$ 1 が Thr サイトから離れて位置しているなど違いが見られた (Fig. 4-3C)。これらの Thr の認識に関わるアミノ酸残基は CgAK $\beta$ でもほぼ保存されており、CgAK $\beta$ の Thr 結合サイトで見られたように、Thr のカルボキシル基は helix  $\alpha$ 1 の N 末近くに位置し、helix dipole の N 末の正電荷が負電荷をもつカルボキシル基の認識に関わっていると考えられる。また、TtAK $\beta$ -Thr の構造中でも Thr は2つのサブユニットの間に埋まるように結合し、表面に露出していないことから、CgAK $\beta$ の場合と同じく、Thr がダイマー構造の安定化に重要な役割を持つことが示唆された。

#### 4-3-3 Thr 結合による TtAK $\beta$ のオリゴマー状態への影響

第二章で示したように、CgAK $\beta$ では Thr 結合がそのダイマー化を誘導する。TtAK $\beta$ -Thr の構造でも Thr が CgAK $\beta$ の Thr 結合サイトと同様の位置に埋まるように結合していることから、TtAK $\beta$ においても Thr が $\beta$ サブユニット (活性制御ドメイン) のダイマー化に関与している可能性が考えられた。この Thr による TtAK $\beta$ ダイマー化への影響を調べるため、ゲルろ過クロマト

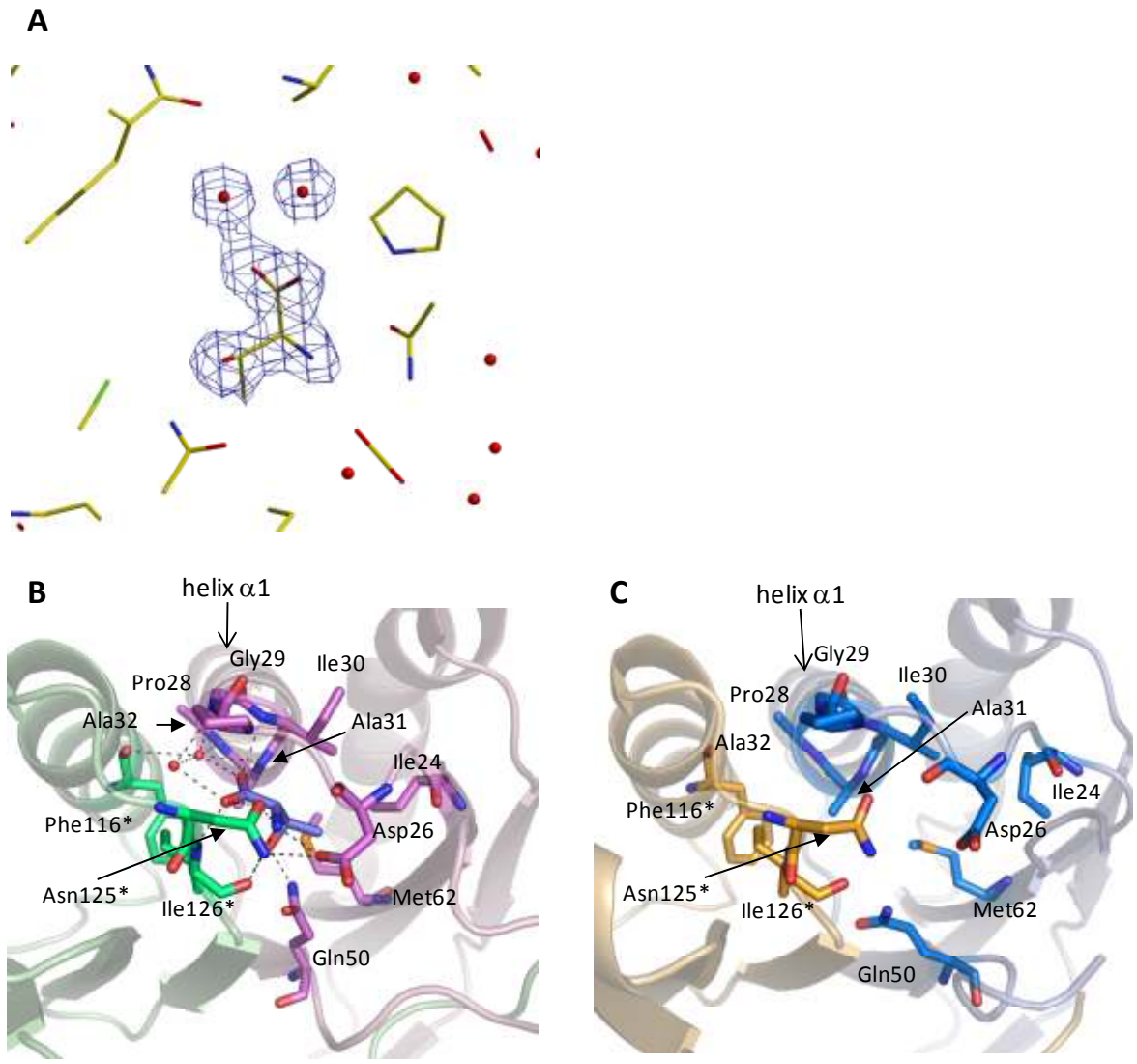


Figure 4-3 Thr 結合サイト

- A. Thr と 2 つの水分子の  $2F_o - F_c$  マップ ( $1\sigma$ )。
- B. TtAK $\beta$ -Thr における Thr 結合サイト。chain A と B はそれぞれ紫と緑で示し、Thr は青のスティックモデルで示した。
- C. TtAK $\beta$ -free における Thr 結合サイト。chain E と chain F をそれぞれ青とオレンジで示した。



グラフィーや超遠心分析による分子量測定を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析の結果、Thr 非添加条件ではその溶出体積から 21.7 kDa と見積もられ、TtAK $\beta$ モノマーの理論値(17.7 kDa)より大きめの値となった(Fig. 4-4A)。一方、5 mM Thr を添加した場合は、その分子量は 30.9 kDa と見積もられた。

TtAK $\beta$ のモノマー・ダイマー平衡に対する Thr の影響をより確かなものにするため、沈降平衡法による解析を行った。得られたデータはモノマー・ダイマー平衡のモデルによくフィットし、その平衡定数は 5 mM Thr 添加、非添加条件でそれぞれ  $5.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  (goodness of fit =  $4.0 \times 10^{-4}$ )、 $9.1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$  (goodness of fit =  $2.3 \times 10^{-4}$ ) となった。これらの平衡定数から、Thr 非存在下では 1 mg/ml の TtAK $\beta$ のほとんど(91 %)がモノマーとして存在し、一方で Thr 存在下では 31 %がダイマーとして存在していることが分かった。また、結晶化に用いた濃度である 5 mg/ml での測定では、Thr 存在下、非存在下でそれぞれ 58 %、27 %がダイマーとして存在していることが分かった。

さらに、TtAK 全長における $\alpha$ サブユニット内の活性制御ドメインと $\beta$ サブユニットの相互作用についてもゲルろ過クロマトグラフィーを用いて解析した。CgAK は Thr 非存在下で精製を行うと $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが容易に解離してしまうが、TtAK は Thr の有無に関わらず $\alpha_2\beta_2$ として生成される。このことから TtAK においては $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの相互作用が CgAK よりも強いことが示唆される。しかしながら、TtAK のゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターンは、Thr 存在下ではシャープなピークが得られるのに対し、Thr 非存在下ではブロードなピークとなる。実際、それぞれの条件でのゲルろ過クロマトグラフィーのフラクションを SDS-PAGE に供すと、Thr 存在下では $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが同じ体積で溶出しているのに対し、Thr 非存在下では $\beta$ サブユニットは $\alpha$ サブユニットに遅れて溶出してくることが分かる(Fig. 4-4B-E)。これらの結果から、 $\beta$ サブユニットは Thr 非存在下でも $\alpha$ サブユニットの活性制御ドメインと相互作用することはできるが、Thr 存在下の方がその相互作用は強いことが示唆された。

#### 4-3-4 Thr 結合サイトへの変異の影響

TtAK $\beta$ の ACT1 中の残基であり、Thr の側鎖のヒドロキシル基を認識している Gln50( $\beta$ )( $\alpha$ サブユニットでは Gln294( $\alpha$ ))を Ala に置換する変異を導入し、変異体における Thr に対する感受性を調べた。変異体は 3 種類作製し、 $\beta$ サブユニットの Gln50( $\beta$ )のみ(TtAK- $\beta$ Q50A)、 $\alpha$ サブユニットの Gln294( $\alpha$ )のみ(TtAK- $\alpha$ Q294A)、またその両方(TtAK- $\alpha$ Q294A/ $\beta$ Q50A)

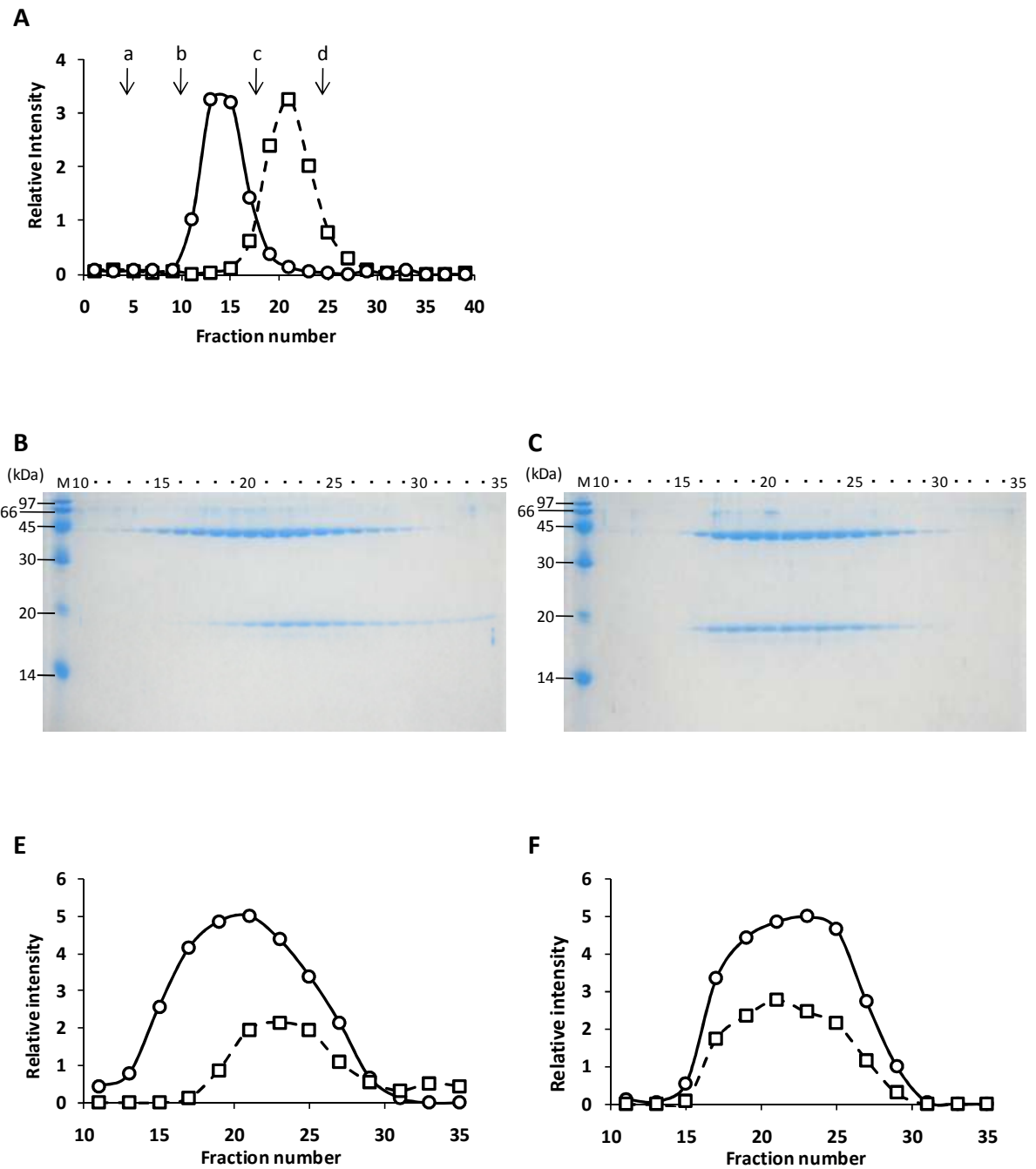


Figure 4-4 TtAK と TtAK $\beta$  の Thr によるオリゴマー状態への影響

A. TtAK $\beta$  のゲルろ過クロマトグラフィーにおける溶出プロファイル。実線と○は 5 mM Thr 添加時、点線と□は非添加時の様子を示す。分子量マーカーの溶出体積を矢印で示した(a; BSA (67 kDa), b; chymotrypsinogen (43 kDa), c; ovalbumin (25 kDa), d; ribonuclease A (13 kDa))。

B-F. TtAK のゲルろ過クロマトグラフィーにおける溶出プロファイル。B と F は Thr 非添加、C と E は Thr 添加した条件での様子を示す。B, C は溶出画分の SDS-PAGE であり、E, F は SDS-PAGE のバンドの濃さを解析したグラフである(それぞれ、実線と○が $\alpha$ サブユニット、点線と□が $\beta$ サブユニットを示す)。

を Ala に置換した。

活性測定の結果、全ての変異体で Thr による阻害が解除されていた (Fig. 4-5)。しかし、 $\alpha$  サブユニットの Gln294( $\alpha$ ) に変異が導入された TtAK- $\alpha$ Q294A や TtAK- $\alpha$ Q294A/ $\beta$ Q50A では完全に Thr による阻害が解除され、むしろ活性が 10 % 程度上昇しているのに対し、 $\beta$  サブユニットのみに変異が導入された TtAK- $\beta$ Q50A では Thr の添加により 20% 程度の活性の低下が見られた。このことから、 $\alpha$  サブユニット内の活性制御ドメインと  $\beta$  サブユニットは TtAK の活性制御において異なる働きを持つことが示唆された。

#### 4-3-5 CgAK $\beta$ と TtAK $\beta$ の CD スペクトル

TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ はアミノ酸配列相同性を 36 % 持ち、Thr が結合した結晶構造はよく似ていた。しかし、TtAK $\beta$ は高度好熱菌由来のタンパク質であり CgAK $\beta$ は常温菌由来のタンパク質であるため、その熱安定性には違いがあると考えられた。これらの熱安定性の比較を行うため、CD スペクトルを用いた測定を行った。

温度変化に伴う 222 nm での吸光度変化により、各タンパク質のそれぞれの条件での変性温度 ( $T_m$ ) を算出した。CgAK $\beta$ の  $T_m$  は Thr 非存在下では 50.3 °C であり、Thr 存在下では 52.4 °C となった。一方、TtAK $\beta$ では Thr の存在、非存在に関わらず 95 °C までに完全変性状態とならず、 $T_m$  を算出することができなかった。

#### 4-3-6 CgAK $\beta$ と TtAK $\beta$ の DSC 測定

CD スペクトルでは測定温度を 95 °C までしか上昇させることができないため、TtAK $\beta$ の完全変性が見られず変性温度を算出することができなかった。そこで、130 °C 近くまで温度を上昇させることができ、タンパク質が天然構造を維持しているかどうかの正しい評価のできる示差走査型熱量計 (DSC; Differential Scanning Calorimeter) を用いて CgAK $\beta$  及び TtAK $\beta$  の熱安定性の評価を行った。Fig. 4-6 に各タンパク質の温度変化に伴う熱容量 ( $C_p$ ) 変化のグラフを示す。解析の結果、TtAK $\beta$ の  $T_m$  は 91.7 °C、CgAK $\beta$ は 50.9 °C と算出され、TtAK $\beta$  は CgAK $\beta$  に比べて約 40 °C 安定であることが分かった。また、5 mM Thr の添加によりどちらのタンパク質も約 4 °C 変性温度が上昇した。一方、CgAK におけるもう一つの阻害剤である Lys は CgAK $\beta$ の安定性には影響を与えなかった (Table 4-2)。

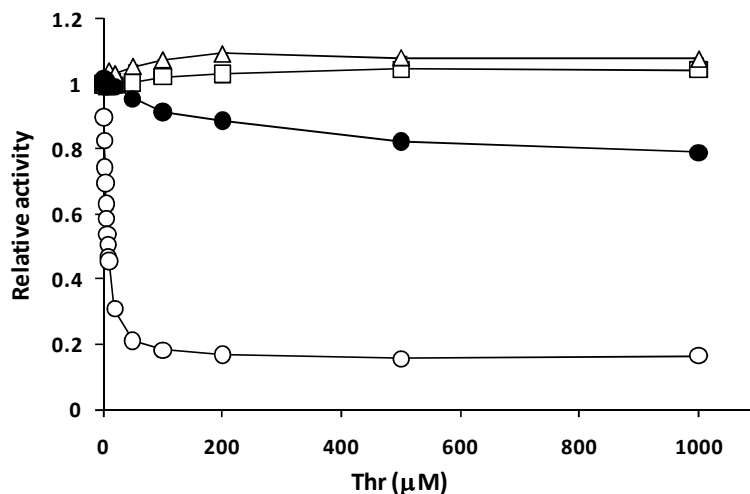


Figure 4-5 Q294(α)50(β)A 変異体の阻害プロファイル  
 ○; Wild type TtAK, □; αβQ294(50)A, △; αQ294A, ●; βQ50A

Table 4-2 TtAKβとCgAKβの変性温度

オリゴマー状態		CDスペクトル		DSC	
		CgAKβ	TtAKβ	CgAKβ	TtAKβ
No additives	モノマー	50.3	not calculated	50.9	91.7
5 mM Thr	ダイマー	52.4	not calculated	55.2	96.1
5 mM Lys	モノマー	-	-	50.3	-
5 mM Thr + Lys	ダイマー	-	-	56.6	-

(°C)

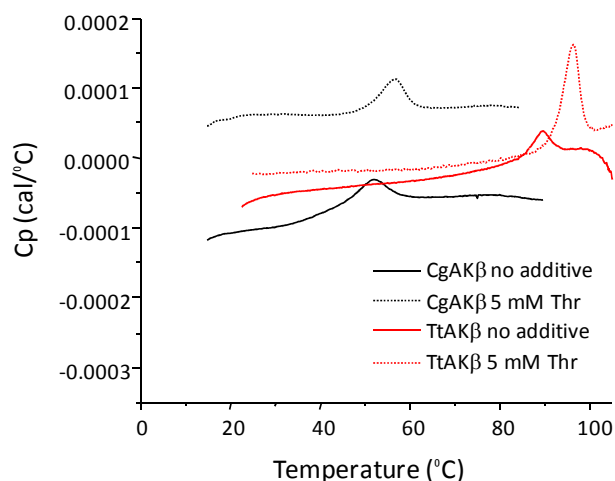


Figure 4-6 DSC 測定  
 黒は CgAKβ、赤は TtAKβ を示し、実線は 5 mM Thr 非添加、点線は 5 mM Thr 添加条件での様子を示す。

## 4-4 考察

### 4-4-1 TtAK $\beta$ の Thr 結合による構造変化とその意味

TtAK $\beta$ -Thr と TtAK $\beta$ -Free の構造の違いは予想していたよりも小さく、2 つの構造の C $\alpha$ の rmsd は約 1.5 Å であった。EcAKIII の阻害剤である Lys の結合した不活性型の構造と活性型構造ではその活性制御ドメインダイマーの構造は Lys の結合によって大きく変化し、その変化により活性中心のアミノ酸残基の構造変化を引き起こすといわれているが、TtAK $\beta$ の Thr 結合による変化はこれとは対照的である。TtAK $\beta$ -Thr と TtAK $\beta$ -Free の構造間で目立った違いは、TtAK $\beta$ -Free では Thr 結合サイトを覆うように存在する loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 が disorder していること、Thr 結合サイトの周りに  $\beta$  strand が TtAK $\beta$ -Free で外に開き、これにより ACT1 を固定して重ね合わせたときに、ACT2 が 12° 回転していることである (Fig. 4-7 A-D)。また、結晶構造では、結晶化に用いたタンパク質濃度が高濃度であったため TtAK $\beta$ -Thr も TtAK $\beta$ -Free もダイマー構造を取っていたが、ゲルろ過クロマトグラフィーや超遠心分析により、Thr の添加により、モノマー・ダイマー平衡がダイマー側に傾くことを示しており、TtAK においても CgAK と同様の Thr 結合に伴う構造変化が起こると予想される。第二章、第三章で示したように site 1 (Thr 結合部位) 近くに存在する loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 上のアミノ酸への変異の導入により、CgAK は Lys または Lys アナログである AEC 耐性となる。しかしながら、Lys は site 2 に結合するため、その loop の活性制御への直接の影響は明らかとなっていない。TtAK $\beta$ では、TtAK $\beta$ -Free において ACT1 の site 1 周辺の strand  $\beta$ 2 から  $\beta$ 4 を中心として、 $\beta$  strand が TtAK $\beta$ -Thr に比べて外側に開いた構造を取っているが、それに伴って site 2 周辺にも構造の変化が見られる (Fig. 4-7 A-C)。この構造の違いから、Thr が site 1 に結合することで site 2 の構造変化を誘起し、その構造変化によって site 2 にも Thr が結合できるようになる可能性も考えられる。

さらに、TtAK $\beta$ は Thr のカルボキシル基の認識に関わると考えられる helix dipole となる helix  $\alpha$ 1 の N 末端に Pro-Gly (28-29) 配列を持つ (Fig. 4-3B)。興味深いことに、Gly29 の二面角が Thr の結合に伴い変化していた (例えば、TtAK $\beta$ -Thr の chain A では  $\phi = 89.95^\circ$ 、 $\psi = -13.64^\circ$  であるが、TtAK $\beta$ -Free の chain E では  $\phi = 103.16^\circ$ 、 $\psi = -11.53^\circ$  である)。同じく site 1 に Thr を結合する CgAK $\beta$ でも、この Pro-Gly 配列は同じ位置に保存されて存在する (残基番号は 27-28) (Fig. 4-8)。CgAK $\beta$ では Pro27-Gly28 に加えて、同様の Pro-Gly 配列を Lys が結合する site 2 を形成する helix  $\alpha$ 3 の N 末の 109-110 にも持っており (Fig. 4-8)、Lys の

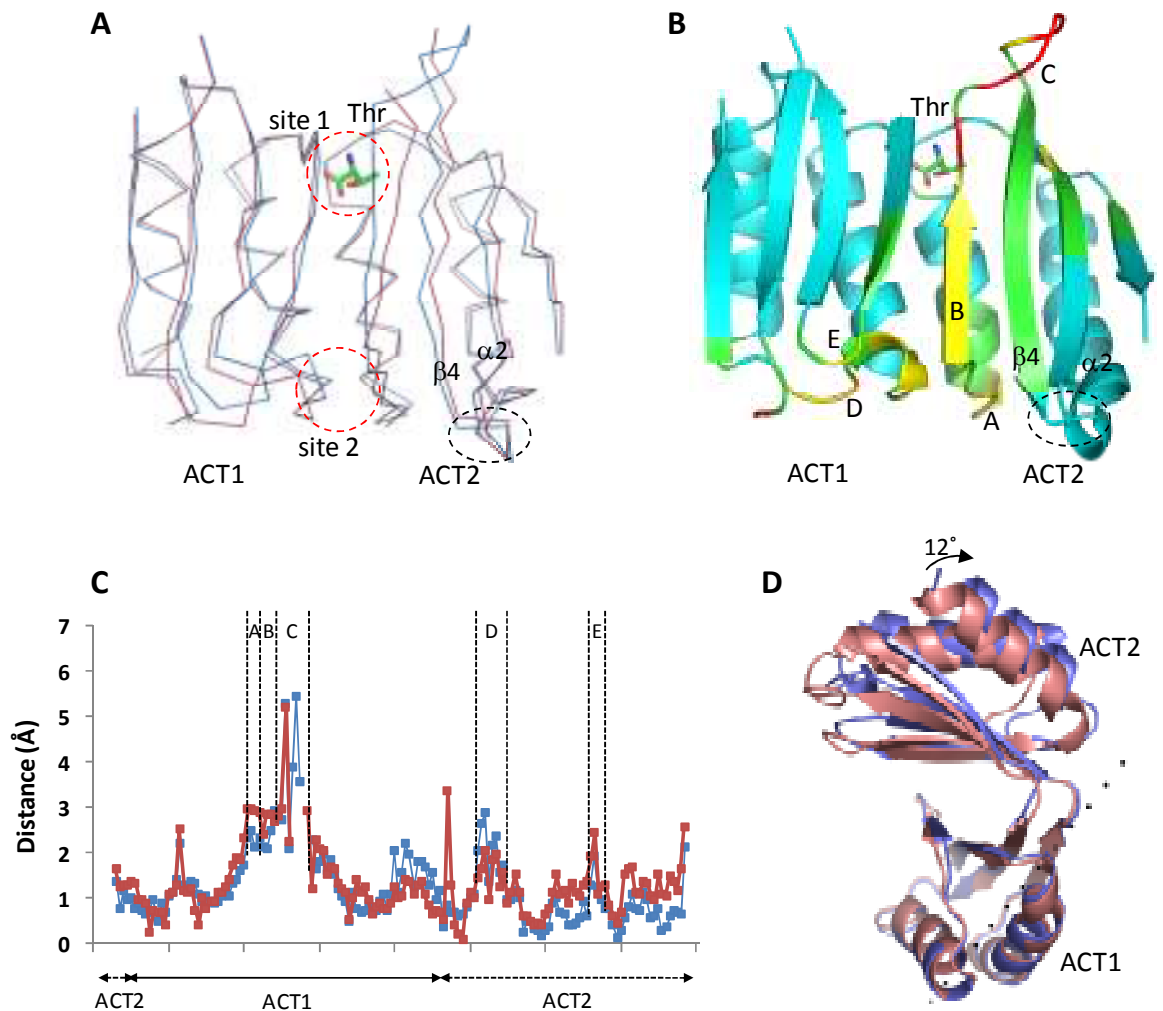


Figure 4-7 TtAK $\beta$ -Thr と TtAK $\beta$ -free の比較

- A. TtAK $\beta$ -Thr (青)と TtAK $\beta$ -free (赤)のエフェクター結合部位の比較(C $\alpha$  traceを示す)。ACT1 は TtAK $\beta$ -Thr の chain B と TtAK $\beta$ -free の chain F(15-93)、ACT2 は TtAK $\beta$ -Thr の chain A と TtAK $\beta$ -free の chain E(5-14 と 94-157) 由来。
- B. TtAK $\beta$ -Thr の構造を、Thr に伴う構造変化の距離(C $\alpha$ 間)によって色分けした図(シアン; < 1 Å, 緑; < 2 Å, 黄色; < 3 Å, オレンジ; < 4 Å, 赤; > 5Å)。特に構造変化の大きかった領域を A-E で示した(Fig. 4-7C の A-E に対応)。
- C. TtAK $\beta$ -Thr と TtAK $\beta$ -free の C $\alpha$ 距離。TtAK $\beta$ -Thr の chain A と TtAK $\beta$ -free の chain E の距離を青で、TtAK $\beta$ -Thr の chain B と TtAK $\beta$ -free の chain F の距離を赤で示す。
- D. Thr 結合によるドメインの動き。TtAK $\beta$ -Thr を青、TtAK $\beta$ -free を赤で示す。点線は回転軸を意味する。

結合に伴い Gly110 の二面角が変化していた。これらの情報から、この Pro-Gly モチーフが  $\alpha_2\beta_2$  型の AK において、エフェクター結合による構造変化を容易にするヒンジのような役割を持つことが示唆される。一方 TtAK $\beta$ では、CgAK $\beta$ の site 2 の Pro109-Gly110 に対応する残基が Pro109-Glu110 となっている (Fig. 4-8)。TtAK $\beta$ -Thr と TtAK $\beta$ -Free における Gly29 の二面角はどちらも Ramachandran plot の許容範囲内であるが、Gly29 にみられたエフェクター結合に伴う大きな二面角の変化は Glu では起こらない可能性が考えられる。このため、現時点では 2 番目の Thr が site 2 に結合するかどうかを断定することはできないが、CgAK において Lys が活性制御ドメインダイマーの構造では観察されなかったのに対して、 $\alpha_2\beta_2$  全長構造では観察されたように、TtAK でも  $\alpha_2\beta_2$  の全長構造を決定することでこの疑問に答えられるかもしれない。

また、CgAK と TtAK の配列を比較すると CgAK には TtAK には見られない ACT ドメインの構成には関わらない  $\beta$  strand ( $\beta_9$ ) が存在している。第三章で示したように、CgAK においてこの  $\beta$  strand は Lys 結合による構造変化に関わることが示唆されており、TtAK は Thr のみで活性制御を受けることから、この strand  $\beta_9$  が CgAK において Lys 結合による活性制御に関わることが支持される。

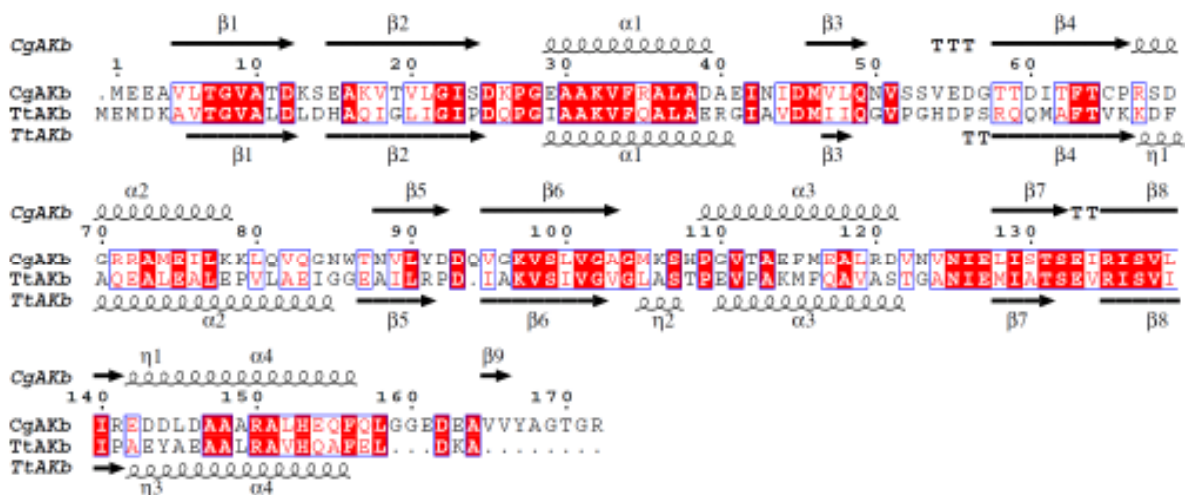


Figure 4-8 TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ のアミノ酸配列アラインメント

#### 4-4-2 他の AK との比較とそれから想像される TtAK の活性制御機構

TtAK と同じく Thr によって制御を受ける *M. jannaschii* 由来の AK (MjAK) の結晶構造はすでに決定されている[59]。MjAK の結晶構造は(i)基質 (MgAMPPNP、Asp) 結合型(ii)Asp 結合型(iii)Thr 結合 (阻害) 型で決定されており、Thr 結合型の構造は Lys によって制御を受ける EcAKIII とよく似ていた。しかし、EcAKIII では異なるサブユニット由来の ACT1 同士で構成されるエフェクター結合ユニットに Lys が結合しているが、MjAK では ACT2 同士で構成されるエフェクター結合ユニットに Thr は結合していた。EcAKIII では、R-state から T-state へのリジン結合による変化の過程でダイマーからテトラマーへと変換し、活性制御ドメインの長い loop の構造変化を起こし、この loop が基質の結合を妨げるといわれている[38]。また、MjAK では EcAKIII で活性制御に重要な役割を持つ長い loop は見られないが、Thr 結合によって活性制御ドメインが触媒ドメインの方へと回転していた。この構造変化に伴って触媒ドメイン由来の ATP や Asp 結合に関わる loop の位置がずれることで、活性が制御される。TtAK $\beta$ では、EcAKIII で活性制御に関わる loop に相当する loop  $\beta 4$ - $\alpha 2$  は短く、Thr 結合による構造変化は見られなかった (Fig. 4-7A, B)。MjAK では、Thr 結合により活性制御ドメインは触媒ドメインから離れる方向へ  $6.5^\circ$  回転するといわれている。一方で、TtAK では Thr 結合に伴い、ACT2 が ACT1 から離れる方向へ  $12^\circ$  回転していた。Thr の結合に伴うこの動きが、TtAK の  $\alpha_2\beta_2$  型全長構造においてどのような動きを引き起こし、活性制御に影響を与えるのかはわからないが、CgAK において第二番目のエフェクターである Lys の結合によって閉じた構造が安定化されるように、TtAK でもこの動きによって、site 2 に Thr ができるようになり、TtAK の不活性型構造を安定化させる機構が存在するかもしれない。第二章、第三章で述べてきたように CgAK ではその活性制御ドメインに Thr のみ、または Thr と Lys が結合した構造を決定しているが、Thr の結合していない活性制御ドメインの構造は決定できていない。CgAK の場合 Thr 非存在下では、その活性制御ドメインとサブユニット間のアフィニティーは弱いと考えられるが、TtAK $\beta$ -Thr と TtAK $\beta$ -free 間で見られた構造変化と同様の構造変化が生じている可能性が示唆された。

さらに、MjAK における ITC (Isothermal titration calorimetry、等温滴定カロリーメリー) 分析や結晶構造により、MjAK は活性制御ドメイン中の高親和性の Thr 結合サイトだけでなく、ダイマーあたり 5 つの弱い非特異的な Thr 結合サイトを持つことが示されており、その中には活性中心の Asp 結合部位も含まれていた。現時点では、TtAK の  $\alpha_2\beta_2$  型全長構造の決定に至っていないので、TtAK が MjAK のような弱い Thr 結合サイトを持つかどうかはわからない。



しかしながら、TtAKの  $K_i$  値は 10  $\mu$ M 以下であり、0.3 mM である MjAK[100]よりも顕著に低いことから、TtAK では活性制御ドメイン中の高親和性の Thr 結合サイトのみを通じて活性制御されていると考えられる。

#### 4-4-3 TtAK $\beta$ の高い熱安定性の要因

TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ の CD スペクトル及び DSC 測定により、TtAK $\beta$ が CgAK $\beta$ よりも約 40 °C 高い変性温度を持つことが示された。TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ は互いに 36 %のアミノ酸相同性を示し、その Thr 結合型の結晶構造もよく似ていることから、タンパク質の熱安定性の違いやその要因を議論するにはよい対象であると考えられる。

CgAK $\beta$ と TtAK $\beta$ のどちらも、Thr 存在下では変性温度が約 4 °C 上昇した。TtAK $\beta$ で明らかにしたように、おそらく CgAK $\beta$ も、モノマーとダイマーの平衡状態にあり、その平衡が Thr 結合によりダイマーになりやすい方向に移動すると考えられる。このことから、この 2 つのタンパク質が Thr 存在下で安定性が上昇したのは、Thr 結合によるダイマー化が要因だと考えられる。多量体形成により熱安定性が向上するという例が、*T. thermophilus* 由来の耐熱性の Homoisocitrate dehydrogenase でも報告されている[101]。TtAK $\beta$ の結晶構造における dimer interface の接触面積は TtAK $\beta$ -Free では 3200 Å<sup>2</sup> であるのに対し、TtAK $\beta$ -Thr では 3890 Å<sup>2</sup> と広くなっており、Thr の結合によってダイマーの 2 つのサブユニットの相互作用が強くなっていることで熱安定性が向上したと考えられる。

タンパク質の安定性には様々な因子が寄与するといわれており、疎水性相互作用[102]や水素結合やイオン結合[103]、タンパク質内部のキャビティ(空隙)の占める割合[104]や、その他のエントロピーに寄与する因子[105]などが挙げられる。タンパク質はこれらの要因を組み合わせることで安定化しており[106]、その中でも水素(イオン)結合数の増加やタンパク質内部のパッキングが、タンパク質安定化の最も重要な因子であるといわれている[107, 108]。CgAK $\beta$ と TtAK $\beta$ の熱安定性の違いを理解するため 2 つのタンパク質の結晶構造を比較した。イオン結合や水素結合の数を比較すると、予想に反してどちらも CgAK $\beta$ の方が多く見られた(Table 4-3)。対称的に、TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ の結晶構造内のキャビティの体積を計算すると、CgAK $\beta$ に比べて TtAK $\beta$ の方が小さく(Table 4-4)、TtAK $\beta$ の方がよりきつくパッキングしていることが示唆される。それぞれのタンパク質中のアミノ酸組成を比べても TtAK $\beta$ の方が疎水性タンパク質の割合が多いことが分かる。また、このアミノ酸組成の比較から、TtAK $\beta$ に Pro が顕著に多く存在していることが分かる(Table 4-5)。TtAK $\beta$ においてほとんどの Pro 残基が

loop の N 末や C 末に存在することから (Fig. 4-9)、変性状態における loop の可動性が抑えられていると考えられる。つまり、TtAK $\beta$ では folding の際のエントロピーの損失が少ないことが安定化に寄与していると考えられる。

Table 4-3 イオン結合及び水素結合の数

	TtAK $\beta$	CgAK $\beta$
Hydrophobic bonds	237 (12)	262 (11)
Ionic bonds	22 (2)	78 (16)
< 3 Å	3 (0)	14 (2)
< 4 Å	8 (1)	27 (5)
< 5 Å	11 (1)	37 (9)

括弧内はサブユニット間の結合数を示す。

Table 4-4 溶媒接触表面積 (ASA) 及びキャビティ体積

	TtAK $\beta$	CgAK $\beta$	$\Delta$ (Tt-Cg)
<i>Difference in monomer ASA value (D-N)</i>			
Hydrophobic (Å <sup>2</sup> )	21313 (70)	22291 (68)	-978 (2)
Hydrophilic (Å <sup>2</sup> )	6389 (21)	6709 (21)	-320 (0)
$\Delta G$	283	261	22
Cavity volume (Å <sup>3</sup> )	41.4	110.1	-68.7
(probe 1.4 Å)			

括弧内はアミノ酸残基数あたりの数値を示す。

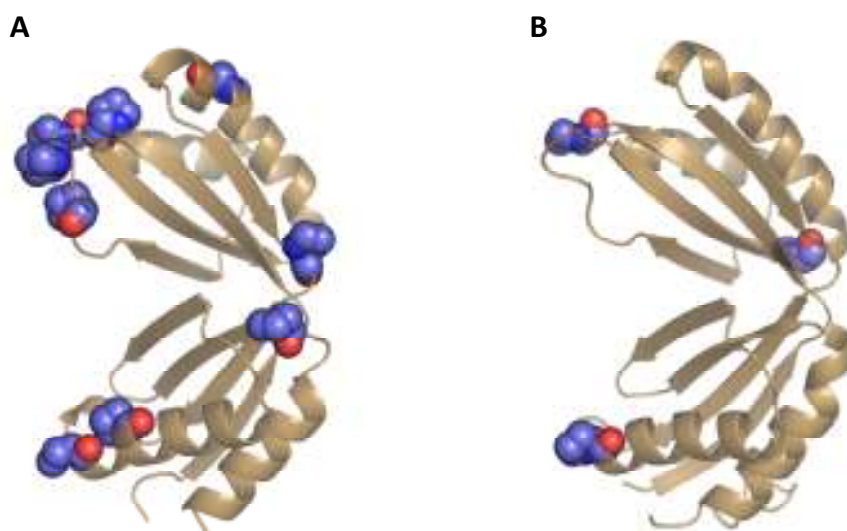


Figure 4-9 TtAK $\beta$  (A)と CgAK $\beta$  (B)における Pro の位置  
Pro は青の CPK モデルで示した。

Table 4-5 TtAK $\beta$ および CgAK $\beta$ のアミノ酸組成

	TtAK $\beta$		CgAK $\beta$	
	Residues	(%)	Residues	(%)
Hydrophobic	102	63.4	88	51.2
Gly	12	7.5	14	8.1
Ala	28	17.4	18	10.5
Val	15	9.3	19	11.1
Leu	11	6.8	14	8.1
Ile	16	9.9	10	5.8
Met	6	3.7	5	2.9
Phe	5	3.1	4	2.3
Trp	0	0	1	0.6
Pro	9	5.6	3	1.7
Neutral	21	13.0	34	19.8
Ser	6	3.7	10	5.8
Thr	5	3.1	11	6.4
Asn	1	0.6	6	3.5
Gln	9	5.6	6	3.5
Cys	0	0	1	0.6
Hydrophilic	38	23.6	50	29.1
Asp	9	5.6	14	8.1
Glu	13	8.1	15	8.7
Lys	7	4.4	8	4.7
His	3	1.9	2	1.2
Arg	5	3.1	9	5.2
Tyr	1	0.6	2	1.2

次に、非変性状態と変性状態の溶媒接触表面積から見積もられる、天然状態から変性状態への自由エネルギー変化を計算した (Table 4-4)。TtAK $\beta$ と CgAK $\beta$ のこの自由エネルギー変化の差は TtAK $\beta$ の方が 22 kcal/mol 多いと計算され、このエネルギーの分 TtAK $\beta$ の方が安定であることが示された。さらに、非変性状態と変性状態のアミノ酸残基あたりの表面積は、親水性表面は Thr の結合した CgAK $\beta$ と TtAK $\beta$ -Thr で変わらないのに対して、疎水性表面は TtAK $\beta$ の方が多かった。つまり、タンパク質内部の疎水性残基が TtAK $\beta$ の安定化に寄与している。実際、タンパク質内部の疎水度は TtAK $\beta$ -Thrの方が CgAK $\beta$ に比べて高かった (Fig. 4-10)。これらの熱安定性に寄与する因子の解析から、TtAK $\beta$ の高い熱安定性は、タンパク質内部の高い疎水度により可能となるきついパッキングや Pro による loop の可動性の低下によると結論付けられる。この知見は、産業上有用なより耐熱性の上昇した CgAK 変異体の創製に役に立つであろう。

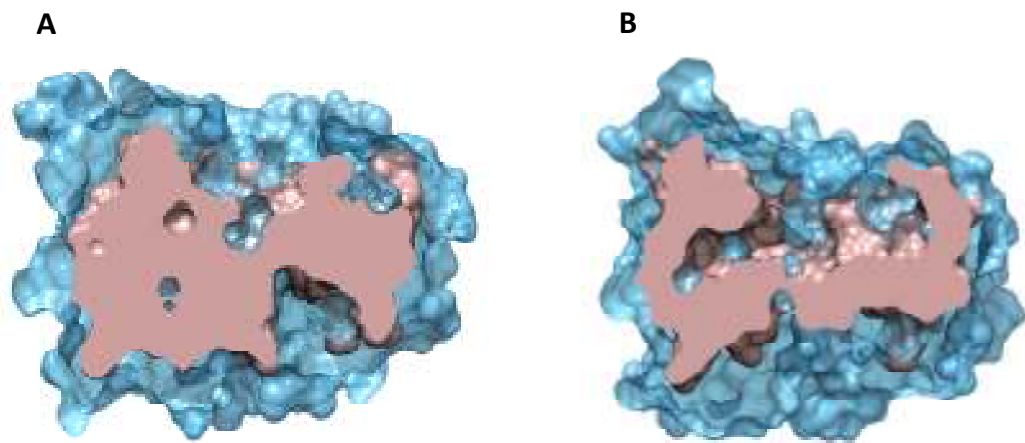


Figure 4-10 TtAK $\beta$ -Thr と CgAK $\beta$ の断面図

表面に存在する残基をシアンで、内部の疎水性残基をピンクで表示した。

## 第五章 *Thermus thermophilus* のリジン生合成酵素 LysZ とキャリアタンパク質 LysW の機能構造解析

### 5-1 背景と目的

高度好熱菌 *T. thermophilus* は細菌でありながらリジンを DAP 経路では生合成せず、 $\alpha$ -アミノアジピン酸(AAA)を経由して生合成する。この新規 AAA 経路における後半の AAA からリジンへの変換過程では、第 1 番目の酵素である LysX の反応により、小さなタンパク質 LysW の C 末の Glu54 の側鎖カルボキシル基と AAA の $\alpha$ -アミノ基がアミド結合することで、この LysW が $\alpha$ -アミノ基の保護基として働いている。その後の LysZ、Y、J では AAA に LysW が付加した状態で反応が進み、LysW の Glu54 側鎖にリジンが結合した形の LysW- $\gamma$ -Lys が生成され、最後の酵素である LysK によって LysW が切り離され Lys が生合成される(Fig. 5-1)。この LysW は極度に酸性のタンパク質であり、一方で AAA から Lys への変換に関わる各酵素の活性中心付近が塩基性領域となっていることから、AAA の保護基として働くだけでなく、各酵素と静電的に相互作用して効率的なリジン生合成を可能にするキャリアタンパク質としての機能を持つことが示唆されている(Fig. 5-1)[23]。LysW はこれまでにキャリアタンパク質として提唱されている脂肪酸合成酵素(FAS; Fatty acid synthase)における ACP (Acyll carrier protein)[109]や NRPS (Nonribosomal peptide synthase)に關与する PCP (Peptidyl carrier protein)[110]に続く新規なキャリアタンパク質であるといえる。ACP と PCP ではタンパク質中の Ser 残基が CoA 体の Phosphopantetheine 基によって修飾され、その中のチオール基が基質のカルボキシル基との間にチオエステル結合を形成する一方、LysW はその C 末の Glu54 の側鎖カルボキシル基と AAA の $\alpha$ -アミノ基がペプチド(アミド)結合を形成しているといった、基質の付加反応の面でも LysW が新規性を持つといえる。

近年、酵母やカビの I 型 FAS の結晶構造が決定され[111, 112]、ACP が FAS の構成因子である Acyl transferase、Ketosynthase、Ketoacyl reductase、Dehydratase、Enoyl reductase、Malonyl/palmitoyl transacylase といった各ドメインによって構成される中心部分の閉ざされた反応チャンバーと呼ばれる部位に存在し、各ドメインの活性中心により静電相互作用によって認識され反応を段階的に進めていくことが示された。*T. thermophilus* のリジン生合成系においても、AAA 以降の生合成に関わる酵素が FAS の各ドメインのように LysW を介して巨大な複合体を形成し、LysW の C 末にある基質の AAA やその誘導体が各酵素によって修飾

を受けてリジンが効率的に生合成されている可能性も考えられる。

そこで、*T. thermophilus* のリジン生合成における AAA から Lys への変換経路の第二番目の酵素であり、AK と同様のリン酸化反応を行うアミノ酸キナーゼ LysZ とその基質である LysW の Glu54 側鎖カルボキシル基に AAA のアミノ基が縮合した LysW- $\gamma$ -AAA の複合体の結晶構造解析を通じて、LysW と LysZ の相互作用様式を明らかにし、LysW のキャリアタンパク質としての機能を明らかにすることを目指した。本章では、キャリアタンパク質 LysW- $\gamma$ -AAA と LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA の結晶構造解析とその変異体を用いた相互作用解析に加え、その他生合成酵素との相互作用に関する知見についても述べる。

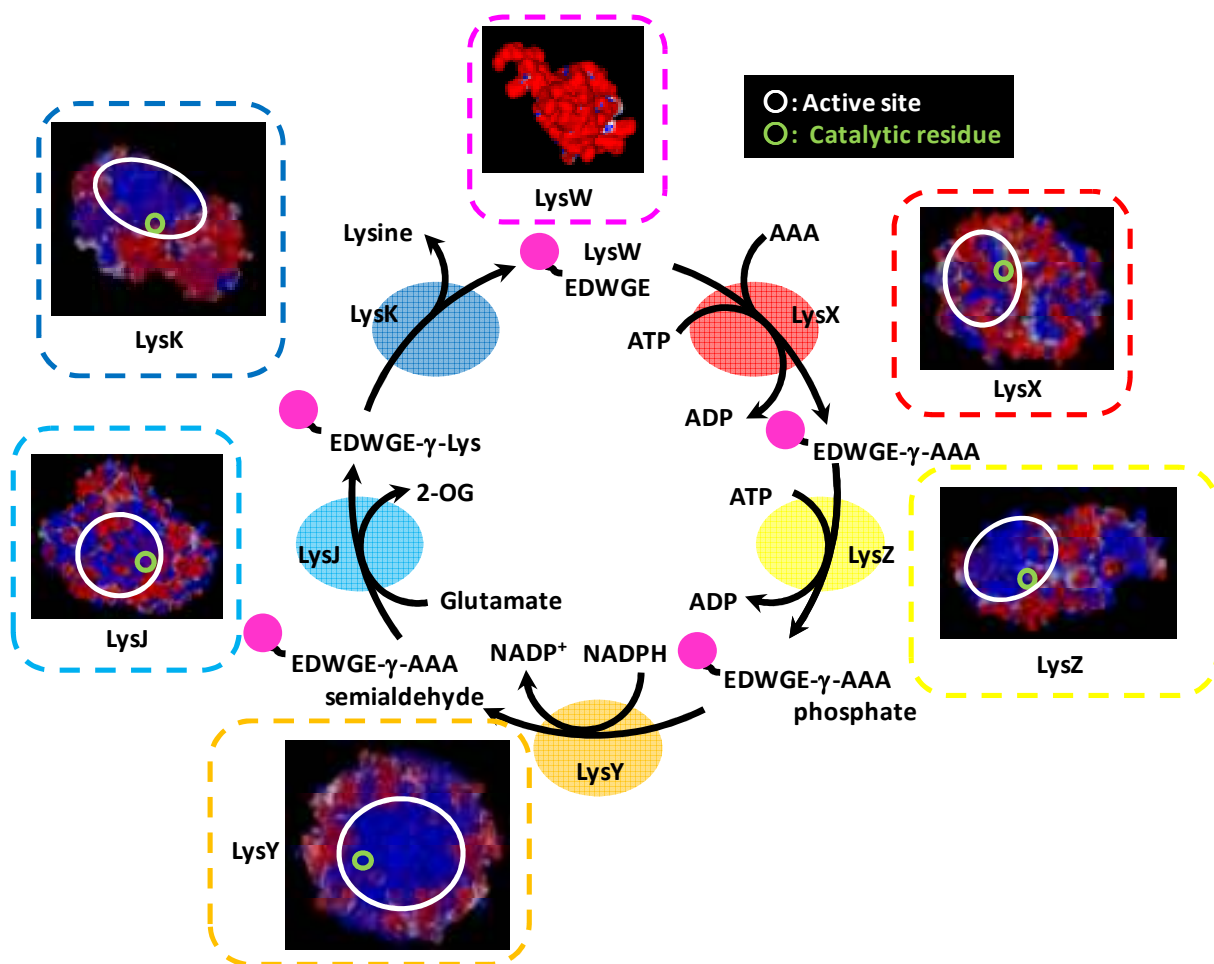


Figure 5-1 *T. thermophilus* のリジン生合成経路 (AAA から Lys への変換過程)

各構造は *T. thermophilus* HB8 由来の結晶構造。LysK は *Lactobacillus delbrueckii* 由来の PepV を鋳型としたモデル構造。LysW は本章で決定した *T. thermophilus* HB27 由来の結晶構造。

## 5-2 方法

### 5-2-1 菌株および試薬類

遺伝子操作や培地などに用いた試薬は第二章に記載したものと同一のものを使用した。LysJ の大腸菌での発現では Spectinomycin を用い、終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$  となるように培地に添加した。また、pACYCDuet-1 をタンパク質発現ベクターとして用いた場合は、その宿主として *E. coli* BL21 (DE3)を用い、それ以外では BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を用いた。結晶化スクリーニングには Hampton Research のキットに加えて Emerald Biosystems のキットも用いた。

### 5-2-2 発現プラスミドの作製

結晶構造解析や変異体解析、LysW との相互作用解析のための組換えタンパク質生産用発現プラスミドは、当研究室にてサブクローニングされていたプラスミドを鋳型として PCR を用いて各遺伝子を増幅し、pET26b(+)の MCS に導入して作製した。LysW や His タグ付きの LysX、LysZ、および LysJ の発現プラスミドは以前に作製されていたものを用いた[23]。LysW は pET26b(+)の MCS の *NdeI/EcoRI* サイトに *lysW* 遺伝子が組み込まれた pET26b-*lysW* を用いた。(His)<sub>6</sub> タグ付きの LysX は pET26b(+)の MCS に C 末に(His)<sub>6</sub> タグを付加した *lysX* 遺伝子が *NdeI/HindIII* で導入された pET26b-*lysX* を用いた。また、LysZ、LysJ はそれぞれ、pACYCDuet-1 の MCS2 と pCDFDuet-1 の MCS1 に *NdeI/KpnI*、*EcoRI/HindIII* を用いて連結した pACYCDuet-*lysZ*、pCDFDuet-*lysJ* を用い、それぞれ C 末と N 末にベクター由来の His タグが付加した形で発現される。

結晶化に用いた His タグが付加されていない LysZ は pET26b(+)に以下のプライマーを用いて増幅した *lysZ* の遺伝子断片を *NdeI/XhoI* で連結し作製した(pET26b-*lysZ*)。

pET26b-*lysZ*-FW: 5'-CCGGAATTCCATATGATCGTGGTCAAGGTGGGA-3'

pET26b-*lysZ*-RV: 5'-CCGCTCGAGTTAGCGTACCACGGTGCCTTC-3'

相互作用解析に用いた His タグを持たない LysY は上の LysZ と同様に pET26b(+)に *NdeI/EcoRI* で *lysY* 遺伝子を導入して作製し、pET26b-*lysY* とした。使用したプライマーは以下に示す。

pET26b-*lysY*-FW: 5'-CCGTCTAGACATATGGATAAGAAAACCCTT-3'

pET26b-*lysY*-RV: 5'-CCGGAATTCTTAGGGGTGAAGCCCCGG-3'

### 5-2-3 タンパク質の精製

pET26b-*lysW*, pET26b-*lysX*, pET26b-*lysZ*, pET26b-*lysY*, pCDEDuet-*lysJ* はそれぞれ *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に、pACYCDuet-*lysZ* は *E. coli* BL21(DE3)に導入し、タンパク質発現株とした。

発現株をそれぞれ対応する抗生物質を添加した 2×YT 培地で 37 °C にて前培養し、培養液を 200 ml の同様の培地が入った坂口フラスコに 1 %植菌し、再び菌体の OD<sub>600</sub> が 0.6 程度に達するまで 37 °C で振盪培養した。この時点で、それぞれのタンパク質の発現に適した濃度の IPTG を添加し、発現に適した温度で引き続き 12-14 時間振盪培養した。それぞれのタンパク質の発現条件を以下に示す (Table 5-1)。培養後の菌体は遠心により回収し、それぞれの方法でタンパク質を精製した。また、各タンパク質の精製度は 15 %アクリルアミドゲルの SDS-PAGE を用いて確認し、LysW や LysW- $\gamma$ -AAA の確認には 12 %アクリルアミドゲルの Tricine SDS-PAGE を用いて確認した。各タンパク質濃度は Bradford 法の Protein Assay (Bio-Rad) または BCA 法の BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology) を用いて測定した。

Table 5-1 各組換えタンパク質の発現条件

Proteins	vector	IPTG (mM)	温度(°)
LysW	pET26b- <i>lysW</i>	0.1	25
LysX (C-His)	pET26b- <i>lysX</i>	0.1	25
LysZ	pET26b- <i>lysZ</i>	1	37
LysZ (C-His)	pACYCDuet- <i>lysZ</i>	1	37
LysY	pET26b- <i>lysY</i>	0	25
LysJ (N-His)	pCDFDuet- <i>lysJ</i>	1	37

#### (a) LysW および LysW- $\gamma$ -AAA の調製

回収した菌体を Buffer H (20 mM MES pH 6.0) で洗浄し、再度 Buffer H にて懸濁し、超音波破碎した。この破碎液を 40,000 × *g* で遠心し、上清に対して 80 °C、30 min の熱処理を行った。再度遠心し、上清を粗抽出液とした。この粗抽出液を Buffer H で平衡化した DE52 陰イオン交換カラム (Whatman) に供し、段階的に NaCl 濃度を上げていくことで精製した。溶出画分を 3,000 MWCO の VIVASPIN (Sartorius) によって濃縮し、Buffer I (20 mM HEPES pH 8.0、150 mM NaCl) で平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって目的タンパク質を分画し、溶出画



分を VIVASPIN で適当な濃度に濃縮し、精製サンプルとした。

また、LysZ の基質となる LysW- $\gamma$ -AAA はこの LysW と AAA を基質として LysX の酵素反応によって調整した。LysX の発現菌体を Buffer J (20 mM HEPES pH 8.0) で洗浄し、Buffer I によって再度懸濁、超音波破碎した。破碎液を遠心にて分離し、上清に対して 80 °C、20 min の熱処理を行った。再度遠心し上清を 20 mM Imidazole を含んだ Buffer I であらかじめ平衡化しておいた His・Bind Resin, Ni-charged (Novagen) に供し、Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーで精製した。LysX が溶出した画分を 10,000 MWCO の VIVASPIN で濃縮した。LysX の酵素反応には DE52 陰イオン交換カラムをかけた後の LysW を用いた。100 mM HEPES pH 8.0、10 mM AAA、10 mM ATP、1 mM MgSO<sub>4</sub> を含む反応溶液に、LysW と LysX をそれぞれ 0.5 mg/ml と 0.05 mg/ml になるように添加し、この反応溶液を 1 ml ずつ遠心チューブに分注して 70 °C で一晩反応させた。反応溶液を再度 DE52 陰イオン交換カラムに供して反応産物である LysW- $\gamma$ -AAA を吸着させ、NaCl を含む Buffer H によって段階的に溶出させ精製した。LysW- $\gamma$ -AAA の含まれる画分を LysW と同様に濃縮し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。溶出画分を適宜濃縮し、これを精製サンプルとした。

#### (b) His タグなし LysZ 及び LysY の精製

His タグの付加されていない LysZ と LysY は同じ方法で精製した。菌体を Buffer H で洗浄、再懸濁の後、超音波破碎した。破碎液を遠心分離し、上清を 80 °C、30 min の熱処理にかけた。再度遠心し、上清を粗抽出液とした。この粗抽出液を Buffer H で平衡化した CM52 陽イオン交換カラム (Whatman) に供し、素通りさせた。この素通り画分を VIVASPIN で濃縮し、Buffer I であらかじめ平衡化した HiLoad 26/60 Superdex 75 にアプライし、素通りさせることで精製した。精製サンプルを適宜濃縮し、結晶化や活性測定、相互作用解析に用いた。

#### (c) His タグ付き LysZ 及び LysJ の精製

His タグが C 末または N 末に付加された LysZ と LysJ の調製は、上に述べた His タグ付きの LysX の精製と同様に行った。Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーで溶出した精製タンパク質をそれぞれ濃縮し、活性測定や相互作用解析に用いた。

#### 5-2-4 LysW- $\gamma$ -AAA、LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体及び LysZ-ADP 複体の結晶化

精製、濃縮した LysZ 及び LysW- $\gamma$ -AAA を全体のタンパク質量を 10 mg/ml となるようにして 2 つのタンパク質のモル比が 1:1 から 1:5 となるように混合し、10 mM ATP またはそのアナログである 10 mM AMPPNP と 10 mM MgSO<sub>4</sub> を添加して結晶化スクリーニングを行った。その結果いくつかの条件で結晶が生成し、その中でも Emerald Biosystems 社の Wizard I の #28 の条件 (20 % (v/w) PEG8000、0.1 M MES pH 6.0、0.2 M Calcium acetate) や Wizard III の #24 の条件 (2 M Ammoniums sulfate、0.1 M Sodium acetate pH 4.6) で良質な結晶が得られた。また、LysZ に 10 mM ADP を加えたドロップでは、Wizard I の #36 の条件 (1 M tri-Sodium citrate、0.1 M Imidazole pH 8.0) で結晶が得られ、沈殿剤濃度や pH の条件の最適化の後、1.1 M tri-Sodium citrate、0.1 M Imidazole pH 8.0 の条件で良質の結晶を得た。

#### 5-2-5 X 線回折データ収集と構造決定

X 線回折データ収集の前に、結晶をクライオプロテクタントとして 20 % (v/v) PEG400 (Wizard I-28 の結晶)、Glycerol (Wizard III-24 及び Wizard I-36 の結晶) を含む結晶化バッファーに移した。Ammonium sulfate が沈殿剤である Wizard III-24 の結晶はクライオプロテクタントバッファーに浸したときに溶けてしまったため、結晶化ドロップからそのまま窒素ガスのストリームにさらして急速に冷却し、95 K のクライオ条件でデータを測定した。データ収集は Photon Factory の NW12 (Wizard III-24、Wizard I-36) と BL-5 (Wizard I-28) で行った。X 線の波長は native データの取得にはどちらも 1 Å を用いた。Wizard III-24 の結晶では XAFS を測定したところ、亜鉛の蛍光 X 線が観察されたため、亜鉛の MAD データを取得した。その際の波長はそれぞれ、peak: 1.28105 Å、edge: 1.28323 Å、remoteH: 1.25720 Å である。実験ステーションに設置されている CCD カメラを用いて収集した反射データはプログラム HKL2000[70]を用いて指数付け、積分、スケールリング処理を行った。

まず、Wizard III-24 の結晶から得られたデータに基づく構造決定を行った。亜鉛の異常分散を用いた MAD 法による位相決定を試みた。この結晶の空間群は  $P3_121$  または  $P3_221$  であり、格子定数は  $a = b = 48.9$  Å、 $c = 38.7$  Å であった。プログラム Solve[90]で亜鉛サイトの同定と位相の決定、Resolve[91]にて初期モデルの構築を行った。この過程で空間群は  $P3_221$  であると決定された。このモデルをサーチモデルとして、native データに対して分子置換法を CCP4[71]のプログラム MOLREP[72]を使って行ったところ、この結晶は複合体ではなく LysW- $\gamma$ -AAA 単体の結晶であることが分かった。得られた初期構造の電子密度図を用

いたモデルの修正には Coot[86]を用い、構造精密化には Refmac5[87]を用いた。さらに、Refmac5 によって決定されたサブドメインによる TLS refinement も行った。

Wizard I-28 の結晶は空間群  $P4_12_12$  に属し、その格子定数は  $a = b = 69.8 \text{ \AA}$ 、 $c = 148.0 \text{ \AA}$  であった。すでに構造が PDB に登録されていた *T. thermophilus* HB8 由来の LysZ の構造 (PDB ID: 2EGX) をサーチモデルとして MOLREP による分子置換法での位相決定を行った。得られたモデルと電子密度を照らし合わせたところ、モデル構造がはまっていない電子密度が見られたため、この構造に加えて上で決定した LysW- $\gamma$ -AAA の構造をモデルにしてさらに分子置換を行ったところ、この結晶が LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA 複合体のものであることが明らかとなった。以後の精密化は LysW- $\gamma$ -AAA の構造解析と同様に行った。

Wizard I-36 の結晶の空間群も  $P4_12_12$  であり、格子定数は  $a = b = 80.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 152.3 \text{ \AA}$  であった。こちらの結晶の反射データについても *T. thermophilus* HB8 由来の LysZ の構造をモデルに分子置換法によって位相を決定し、構造決定した。電子密度図とモデル構造を照らし合わせての精密化は上の 2 つの構造と同様に行った。

これらの結晶構造の妥当性はプログラム MolProbity[89]を用いて確認し、本章の図は PyMOL[77]を用いて作製した。

#### 5-2-6 変異酵素の作製

LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA の複合体の結晶構造における 2 か所のタンパク質の相互作用部位の解析を行うため、これらの部位に変異を導入した変異体を作製した。変異体の発現プラスミドは一部を除き pET26b-*lysZ* を鋳型として以下に示すプライマー (Table 5-2) で Quik-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて変異を導入して作製した。R111E および R112E 変異体は熱耐性が低下していたため、 $\text{Ni}^{2+}$ アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製できるように pACYCDuet-*lysZ* を鋳型として部位特異的変異体を作製した。

それぞれの変異酵素は R111E と R112E を除いて、熱処理後の粗精製サンプルを活性測定などに用いた。また、R111E と R112E は熱処理を行わずに、 $\text{Ni}^{2+}$ レジンに吸着させて Imidazole で溶出させたサンプルを用いた。

#### 5-2-7 LysZ-LysW の相互作用様式の解析

LysZ と LysW の相互作用様式を決定するため、ITC (等温滴定カロリーメーター) による解析を行った。測定には iTC200 (MicroCal) を用いた。セル側には Buffer I 中に 0.1 mM で調製し

た LysZ を用意し、シリンジ側に同じく Buffer I で 0.5 mM に調製した LysW- $\gamma$ -AAA を用意した。測定は 60 °C で行い、120 秒ごとに 2  $\mu$ l の LysW- $\gamma$ -AAA 溶液を 20 回滴定し、その熱量変化を測定した。データ解析は MicroCal 社より提供されている Origin に組み込まれたソフトウェアを用いた。

また、LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の結晶構造の相互作用を解析するため、表面電荷の計算を行った。解析には Discovery Studio 2.0 (Accelrys) の Delphi モジュールを用いた。

Table 5-2 変異体作製に用いたオリゴヌクレオチド配列

変異体	Primers
K5A	Fw 5'-ATGATCGTGGTC <u>CGCGGTGGGAGGCGCCGAG</u> -3'
	Rv 5'-CTCGGCGCCTCCCAC <u>CGCGACCACGATCAT</u> -3'
K26A	Fw 5'-GCGGCCTCCTTGTGG <u>CGGAGGGGGTAAAGCTC</u> -3'
	Rv 5'-GAGCTTTACCCCC <u>TCCGCCCAAGGAGGCCGC</u> -3'
H57A	Fw 5'-CCCCGCTTCCTCACC <u>GCCCCCGGGGGCAGGTG</u> -3'
	Rv 5'-CACCTGCCCCCGGG <u>GCGGTGAGGAAGCGGGG</u> -3'
S63Y	Fw 5'-CCCGGGGGCAGGTGT <u>ACCGCCTACCGACCGG</u> -3'
	Rv 5'-CCGGTCGGTGAGG <u>CGGTACACCTGCCCCCGGG</u> -3'
R64A	Fw 5'-GGGGCAGGTGAG <u>GCCCCTACCGACCGGAA</u> -3'
	Rv 5'-TTCCGGTCGGTGAGGG <u>GCTCACCTGCCCC</u> -3'
R111E	Fw 5'-AGGCTTTTTGTGGG <u>CGAAAGGAAGACGGCGGTC</u> -3'
	Rv 5'-GACCGCCGTCTT <u>CCTTTCGCCACAAAAGCCT</u> -3'
R112E	Fw 5'-CTTTTTTGTGGG <u>CCGCGAGAAGACGGCGGTCAAG</u> -3'
	Rv 5'-CTTGACCGCCGTCTT <u>CTCGCGGCCACAAAAG</u> -3'
K113E	Fw 5'-TTTGTGGGCCG <u>CAGGGAGACGGCGGTCAAGTAC</u> -3'
	Rv 5'-GTA <u>CTTGACCGCGTCTCCCTGCGGCCACAAA</u> -3'
K117E	Fw 5'-AGGAAGACGGCGGT <u>CGAGTACGTGGAAAACGGC</u> -3'
	Rv 5'-GCCGTTTTCCACGTA <u>CTCGACCGCCGTCTTCCT</u> -3'
K123E	Fw 5'-TACGTGGA <u>AAACGGCGAGGTGAAGTCCACCGC</u> -3'
	Rv 5'-GCGGTGGACCTT <u>CACCTCGCCGTTTTCCACGTA</u> -3'
K125E	Fw 5'-GAAAACGGCAAGGTGG <u>GAGGTCCACCGCGGGAC</u> -3'
	Rv 5'-GTCCCCGCGGTGGAC <u>CTCCACCTTGCCGTTTTC</u> -3'
R128E	Fw 5'-AAGGTGAAGGTCCAC <u>GAAAGGGGACTACACCGGG</u> -3'
	Rv 5'-CCCGGTGTAGTCC <u>CTTCGTGGACCTTCACCTT</u> -3'
T132Y	Fw 5'-CACCGCGGGGACTACT <u>ACGGGACGGTGGAGGAG</u> -3'
	Rv 5'-CTCCTCCACCGTCC <u>CGTAGTAGTCCCCGCGGTG</u> -3'
T134Y	Fw 5'-GGGGACTACACCGGGT <u>ACGTGGAGGAGGTGAAC</u> -3'
	Rv 5'-GTTACCTCCTCCACGTA <u>CCCCGGTGTAGTCCCC</u> -3'
R227E	Fw 5'-GCCCTCGCCCAGGG <u>CGAGATGAAGCGGAAGGTC</u> -3'
	Rv 5'-GACCTTCCGCTTCAT <u>CTCGCCCTGGGCGAGGGC</u> -3'
R230E	Fw 5'-CAGGGCAGGATGAAGG <u>GAGAAGGTCATGGGGGCG</u> -3'
	Rv 5'-CGCCCCATGACCTT <u>CTCCTTCATCCTGCCCTG</u> -3'
K231E	Fw 5'-GGCAGGATGAAGCGGG <u>GAGGTCATGGGGGCGGTG</u> -3'
	Rv 5'-CACCGCCCCATGAC <u>CTCCCGCTTCATCCTGCC</u> -3'

#### 5-2-8 LysZ 反応産物の同定

LysZ 反応産物をトリプシン消化し、MALDI-TOF-MS、LC-MS/MS 分析を行った。MS による分析の際、LysZ の反応産物であると考えられる LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate のリン酸基が不安定で同定できないことが予想されたため、AK の活性測定で用いたヒドロキシルアミンにより、リン酸をヒドロキサム酸として置換することで安定化し MS での検出、同定を試みた。LysZ の反応は以下の組成で行った。

200 mM HEPES pH 8.0

1 mM MgSO<sub>4</sub>

160 mM NH<sub>2</sub>OH-HCl

160 mM KOH

10 mM ATP

0.6 mg/ml (0.1 mM) LysW- $\gamma$ -AAA

以上で構成される反応溶液に終濃度 25  $\mu$ g/ml となるように LysZ を加え、またコントロールとして等量の 20 mM HEPES pH 8.0 を加えたサンプルも用意し 60 °C で 1 時間反応させ、反応産物を SDS-PAGE に供した。

##### (a) タンパク質サンプルの in gel digestion

1 次元 SDS-PAGE ゲル中のタンパク質を、in gel digestion に供した。レーザーブレードで切り出したバンドをマイクロチューブに移し、純水による 37 °C、10 min の洗浄を 5 回繰り返した。100  $\mu$ l の脱染バッファー (50 % CH<sub>3</sub>CN、100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.5) により 37 °C で 10 min 無色になるまで脱染した後、100  $\mu$ l の CH<sub>3</sub>CN 処理を 37 °C で 10 min、さらに濃縮遠心機で 5 min 脱水を行った。乾燥残渣を 50  $\mu$ l の消化液 (0.001 % Trypsin、100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.5) に浸し、37 °C で一晩トリプシン消化を行った。この反応液を遠心分離し、残渣に 50  $\mu$ l の Buffer 1 (50 % CH<sub>3</sub>CN、0.1 % CF<sub>3</sub>COOH (TFA)) を加えて 37 °C で 15 min 抽出し、再度遠心分離した。その残渣にさらに 50  $\mu$ l の Buffer 2 (15 % イソプロパノール、20 % HCOOH、25 % CH<sub>3</sub>CN) を加えて同様に抽出した後、最終的に 80 % の CH<sub>3</sub>CN で抽出を行った。上清および全ての抽出画分をマイクロチューブ内で乾固させ、残渣を 5  $\mu$ l の 0.1 % HCOOH に溶解し、一部を質量分析によるペプチドの同定に供した。

## (b) LC-MS/MS 分析

トリプシン消化したペプチド断片を、ダイレクトナノフロー液体クロマトグラフィー (LC) システム DiNa (KYA Technologies) 及び API QSTAR™ Pulsar ハイブリッド質量分析計 (Applied Biosystems) から構成される、ナノフロー LC-MS/MS システムを用いて分析した。サンプルを Magic C18 RP カラム (Michrom Bioresources) に注入し、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を行った。溶媒には 0.1 % HCOOH (A 液) 及び 0.1 % HCOOH、90 % CH<sub>3</sub>CN (B 液) を用い、B 液を 0 % で 10 min 流した後、B 液濃度を 1.45 %/min で 55 min にわたって上昇させ、最後に B 液濃度 100 % で溶出を行った。流速は 300 nl/min とした。

溶出したペプチドは引き続いて質量分析計に導入し、以下の条件で MS/MS 分析を行った。

イオンスプレー電圧: 2.0-2.8 kV、電子増倍管電圧: 2400 V、カーテンガス: N<sub>2</sub> 10 ml/min、衝突ガス: N<sub>2</sub> 5 ml/min、衝突エネルギー: 20-55 eV

## (c) MALDI-TOF-MS 分析

トリプシン消化したペプチドの断片化及びアミノ酸配列決定は、MALDI タンデム質量分析計 AXIMA-QIT (Shimadzu) によって、波長 337 nm の N<sub>2</sub> レーザー光を用いて行った。CID (衝突誘起解離) における衝突ガスには Ar を用いた。この測定に際しては、MALDI サンプルターゲット上で 0.1-1 pmol のペプチドを 1 µl のサンプルバッファー (10 mg/ml DHB (ジヒドロキシ安息香酸)、0.1 % TFA、30 % CH<sub>3</sub>CN) に溶解した後、乾燥させて行った。なお、測定は陽イオンモードで実行した。

### 5-2-8 活性測定

LysZ の反応産物である LysW-γ-AAA-phosphate をヒドロキサム酸誘導体化した LysW-γ-AAA-hydroxamate は基質である LysW-γ-AAA とは異なる位置に Tricine SDS-PAGE 上でバンドとして現れることから、この 2 つの LysW 誘導体のバンドの濃さから活性の有無や強弱を判断することにした。

変異体の活性測定では反応を基本的には 5-2-7 節に記載した反応溶液組成で行ったが、LysW-γ-AAA の濃度を 0.3 mg/ml とした。また、活性測定に用いた LysZ 濃度も終濃度 10 µg/ml とし、反応時間を 15 min、30 min、60 min として経時変化を追った。反応の停止は 2 × SDS-PAGE Sample Buffer を用い、すぐに煮沸することで完全に LysZ の酵素活性を失わせ

た。反応サンプルをプレキャストゲル Super Sep<sup>TM</sup> Ace (tricine gel) 15-20 % (Wako) に供し、分離した。バンドの濃さの解析は ImageJ[94]を用いて行った。

#### 5-2-9 Native PAGE による複合体検出

LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA の複合体を Native PAGE で検出した。LysZ 濃度を 1 mg/ml に固定し、LysW- $\gamma$ -AAA の濃度を 0.02、0.2、2 mg/ml にしたサンプルや、LysW- $\gamma$ -AAA 濃度を 0.2 mg/ml に固定し、LysZ を 0.01、0.1、1 mg/ml にしたサンプルを 12 %アクリルアミドの Native PAGE に供した。これらのサンプルは各タンパク質と 10 mM ATP、1 mM MgSO<sub>4</sub> を混合し、60 °C で 1 時間インキュベートすることで調製した。また、変異体における解析では、LysZ を 0.5 mg/ml、LysW- $\gamma$ -AAA を 0.2 mg/ml に調製し、同様の過程を経て 10 %ゲルの Native PAGE に供した。

また、LysZ だけではなく LysY や LysJ との複合体解析も同様にそれぞれの補酵素や基質 (5 mM NADPH、50 mM Glu、3 mM PLP) とともに 1 時間ずつ反応させた後、Native PAGE に供した。

#### 5-2-10 LysW- $\gamma$ -AAA の C 末結合部位のモデリング

LysZ によりリン酸化を受ける LysW- $\gamma$ -AAA の C 末が活性中心に結合する場合のモデリングを行った。プログラム Caver[113]やシミュレーションにより LysZ における C 末が入り込む空間を予測し、その経路に他の残基とぶつからないように LysW の C 末の loop 構造 (45-54) を導入した。この手動で構築したモデル構造を Discovery studio (Accelrys) でエネルギー最小化を行った。

## 5-3 結果

### 5-3-1 LysW- $\gamma$ -AAA の結晶構造

LysZ の基質である LysW- $\gamma$ -AAA の結晶構造をそれぞれ 1.20 Å 分解能で決定することに成功した。LysW- $\gamma$ -AAA の構造決定は LysW が結合する亜鉛の異常分散データを利用した MAD 法で行った。この LysW- $\gamma$ -AAA の結晶中にはその結晶学的非対称単位に 1 分子の LysW- $\gamma$ -AAA と 1 分子の亜鉛、90 の水が含まれていた (Fig. 5-2A)。MolProbity による Ramachandran plot では 98.1 % が Favored region に、1.9 % が Allowed region に分類された。X 線回折データと精密化の統計値は Table 5-3 に他の結晶構造とまとめて示す。

LysW- $\gamma$ -AAA の結晶構造は 5 本の  $\beta$  strand で構成される globular ドメインと C 末の 10 残基の extension 領域から構成されており loop  $\beta$ 1- $\beta$ 2 と loop  $\beta$ 3- $\beta$ 4 に存在する計 4 つの Cys 残基による亜鉛の結合が観察された。結晶構造中では LysW の 54 残基に加えて、その C 末端に Glu54 の側鎖にアミド結合でつながった AAA が観察された (Fig. 5-2B)。Glu54 の側鎖カルボキシル基と AAA の  $\alpha$ -アミノ基が共有結合 (ペプチド結合) している様子が観察され、これまでに生化学的に示されてきた LysX による LysW の C 末への AAA の付加反応を構造生物学的に実証することができた。

### 5-3-2 LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の結晶構造

LysW- $\gamma$ -AAA 単体の結晶構造に加え、*T. thermophilus* のリジン生合成経路の AAA から Lys への変換過程の第 2 番目の反応を担う LysZ と基質である LysW- $\gamma$ -AAA の複合体の結晶構造を 1.85 Å で決定することに成功した (Fig. 5-3A, B)。結晶学的非対称単位中には 1 分子の LysZ (モノマー) と、1 分子の LysW- $\gamma$ -AAA、1 分子の硫酸イオン、さらに 255 の水分子が存在していた。LysZ の 220-225 は対応する電子密度が観察されず、disorder しているようであった。また、Ramachandran plot では 98.4 % の残基が Favored region に、1.3 % が Allowed、0.3 % が Outlier region に分類された。

LysZ の構造はそのホモログである ArgB (NAGK) と同様の典型的な AAK family の fold をとっていた (Fig. 5-3C)。LysZ の構造は結晶の対称性を当てはめると ArgB と同様のダイマー構造をとっており、LysZ ダイマーあたり 2 分子の LysW モノマーが相互作用していた。この LysZ-LysW 間の相互作用部位はどの単位を非対称単位とするかによって、strand  $\beta$ 8 のそばと helix  $\alpha$ 8 の N 末を中心とする活性中心付近の 2 か所考えられた (Fig. 5-3A, B)。以



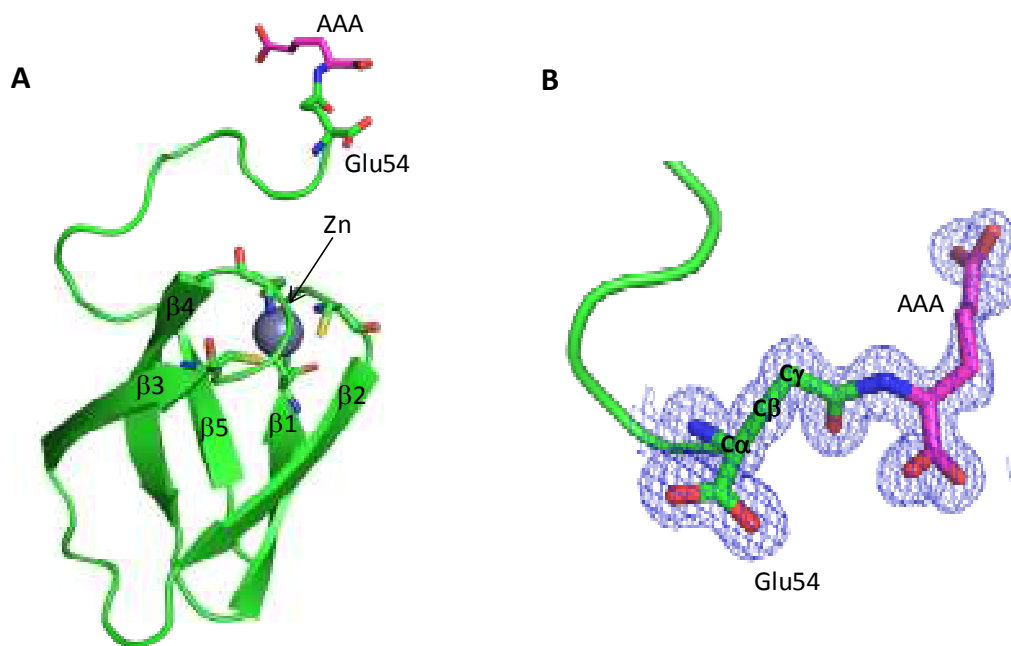


Figure 5-2 LysW- $\gamma$ -AAA の全体構造

A. LysW- $\gamma$ -AAA の全体構造。C 末の Glu54 と AAA、及び Cys 残基をスティックモデルで示した。Zn は sphere モデルで示した。

B. LysW- $\gamma$ -AAA の C 末。Glu54 と AAA の部分の電子密度図は  $2Fo - Fc$  マップ ( $1\sigma$ ) で示した。

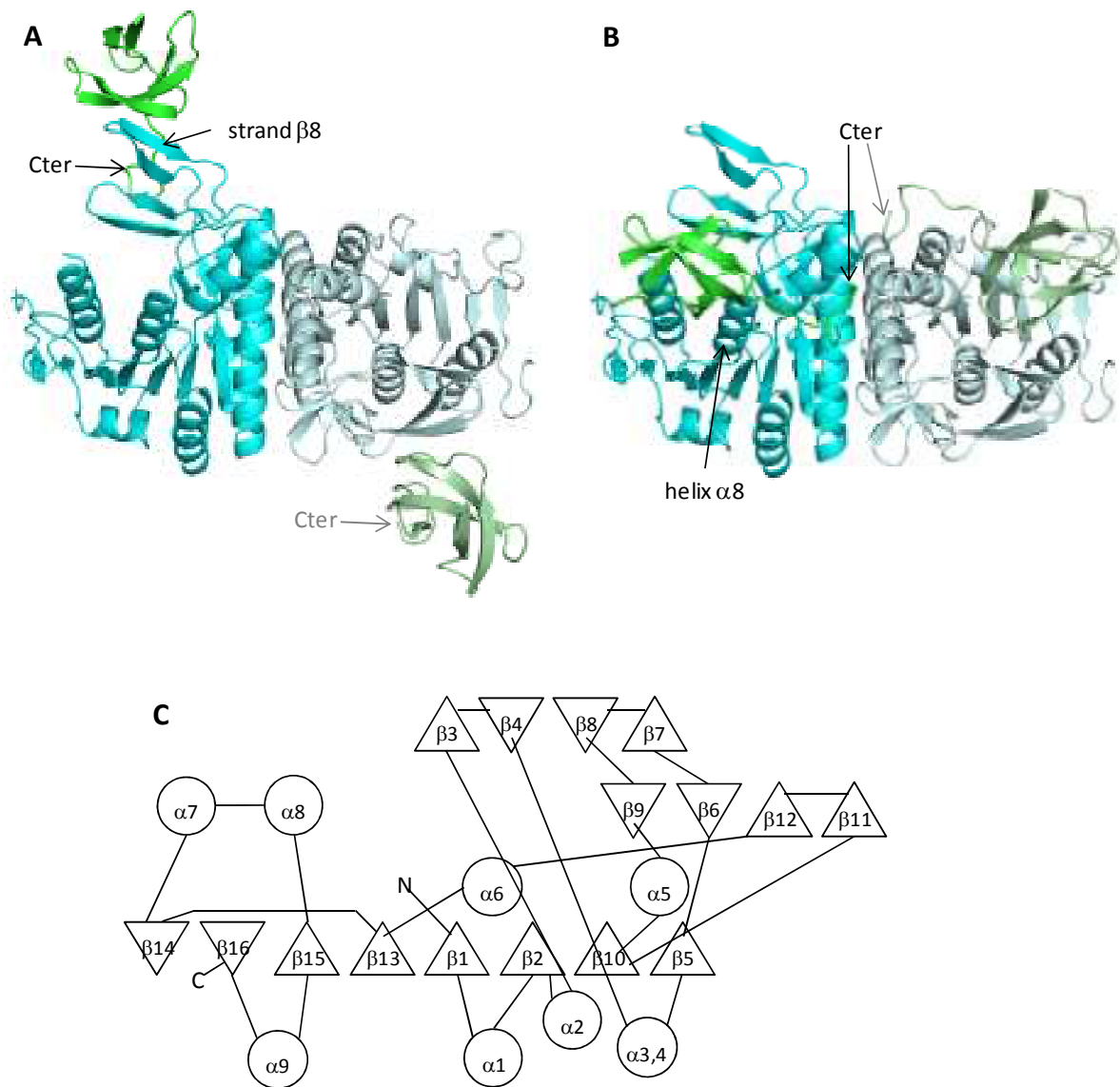


Figure 5-3 LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の結晶構造

A, B. 2か所の LysW 相互作用サイト。LysZ をシアン、LysW- $\gamma$ -AAA を緑で示す。薄い色で示した部分は結晶の対称性により示される別の分子であり、LysZ はダイマー構造を取っている。A は IR 1 を、B は IR 2 を示す。

C. LysZ のトポロジー。 $\beta$  strand は三角で、 $\alpha$  helix は丸で示した。

下、Fig. 5-3A で示される strand  $\beta$ 8 付近の相互作用部位を IR (Interaction region) 1 とし、Fig. 5-3B で示される活性中心付近の相互作用部位を IR 2 とする。また、この複合体の結晶構造では LysW の C 末の AAA は不明瞭な電子密度のために特定できず、さらに LysW が 2 つの相互作用部位のどちらで LysZ と結合するとしても、その C 末は活性中心と予想される部位からは遠いところに位置していた。

### 5-3-3 LysZ-ADP 複合体の結晶構造

LysZ に基質の ATP アナログである ADP を添加した条件で得られた結晶から 2.8 Å 分解能の X 線反射データが得られ、分子置換法による位相決定を行い、LysZ と ADP の複合体の結晶構造を決定することに成功した。この結晶の非対称単位中には 1 分子の ADP が結合した 1 分子の LysZ (モノマー) と 27 分子の水が含まれていた (Fig. 5-4A)。この構造では LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体で観察されなかった部分も含めて LysZ の全ての残基の電子密度が観察された。また、MolProbity による Ramachandran plot では 97.8 % が Favored region に、残りの 1.1 % が Allowed region、1.1 % が Outlier region に分類された。LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体と同様に結晶の対称性を当てはめると LysZ はダイマーで存在していた。

この結晶構造中で ADP は AAK family の酵素で見られるように、その C-lobe に結合しており、Lys5、Gly8、Gly37、Ser38、Tyr78、Tyr200、Arg230 などのアミノ酸残基によって安定に結合していた (Fig. 5-4B)。ここで、Lys5 は ADP の  $\alpha$ 、 $\beta$  位のリン酸基の結合に関わっていた。他の AAK family のキナーゼにおいて ADP との結合においては  $\alpha$ 、 $\beta$  位のリン酸と結合している Lys 残基が、ATP との結合では  $\beta$ 、 $\gamma$  位と相互作用するように位置し、触媒残基として機能することが知られている [62]。以上のことから、LysZ においてもこの Lys 残基が触媒残基として機能すると考えられる。

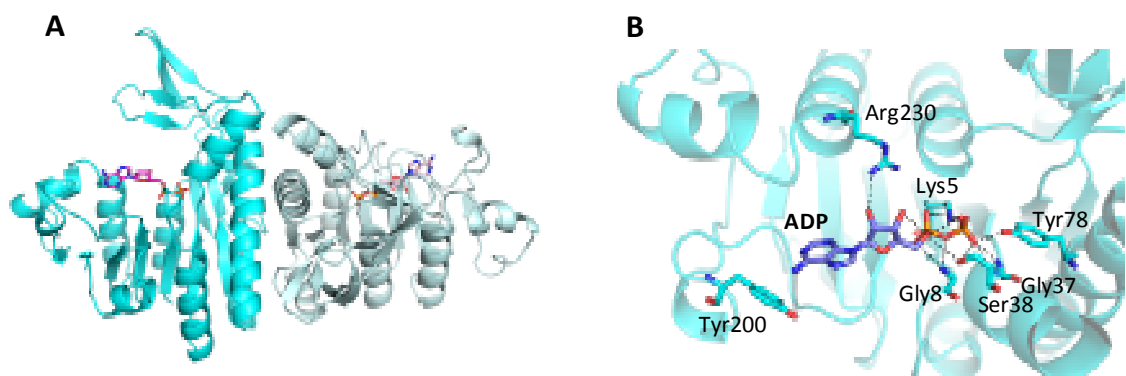


Figure 5-4 LysZ-ADP の結晶構造

- A. LysZ-ADP の全体構造。マゼンタのスティックモデルは ADP を示す。薄い色の分子は結晶の対称性により表示した LysZ ダイマーを構成する分子。
- B. ADP 結合サイト。ADP は青で示し、結合に関係する残基とともにスティックモデルで表示した。

Table 5-3 X線回折データと精密化の統計値

	MAD data of LysW- $\gamma$ -AAA			Native		
	Peak	Edge	Remote	LysW- $\gamma$ -AAA	LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA	LysZ-ADP
Data collection <sup>a</sup>						
X-ray source		PF-NW12		PF-NW12	PF-BL5	PF-NW12
Wavelength (Å)	1.28105	1.28323	1.2572	1	1	1
Space group		$P3_221$		$P3_221$	$P4_12_2$	$P4_12_2$
Cell dimensions (Å)		$a = b = 49.0, c = 38.7$		$a = b = 48.9, c = 38.7$	$a = b = 69.8, c = 148.0$	$a = b = 80.5, c = 152.3$
Resolution (Å)		1.43 (1.45-1.43)		1.20 (1.22-1.20)	1.85 (1.88-1.85)	2.80 (2.90-2.80)
Reflections (total/unique)	195533/10234	194848/10250	197876/10260	339079/17121	449929/32246	184012/13016
$R_{\text{sym}}^b$ (%)	5.6 (17.3)	5.4 (17.2)	5.4 (17.1)	6.5 (23.2)	6.7 (72.0)	4.9 (39.4)
$I/\sigma(I)$	62.4 (16.3)	62.8 (16.1)	65.6 (17.0)	58.6 (11.8)	46.9 (3.6)	30.4 (8.7)
Completeness (%)	96.6 (100.0)	96.1 (100.0)	96.4 (100.0)	97.2 (100.0)	99.8 (100.0)	100.0 (100.0)
Phasing						
Number of Se sites	1					
FOM <sup>c</sup>	0.81					
Refinement						
Resolution (Å)				21.2-1.20	28.7-1.85	42.9-2.80
R-factor <sup>d</sup> (work/test) (%)				14.5/16.5	17.0/21.2	20.4/24.5
Number of atoms				504	2667	2106
Protein atoms				413	2406	2052
Zn				1	1	
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>					5	
ADP						27
Water				90	255	27
Average B-factor						
Protein atoms				12.8	28.4	41.0
Zn				11.4	27.1	84.7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>					30.5	
ADP						
Water				25.3	37.5	41.6
rmsd values						
Bond length (Å)				0.008	0.010	0.007
Bond angle (°)				1.5	1.3	1.1
Ramachandran plot <sup>e</sup>						
favored (%)				98.1	98.4	97.8
allowed (%)				1.9	1.3	1.1
outlier (%)				0	0.3	1.1

<sup>a</sup> Values in parentheses are data for the highest resolution shell.<sup>b</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ <sup>c</sup> Figure of merit was calculated with SOLVE program.<sup>d</sup>  $R\text{-factor} = \sum_{\text{hkl}} ||F_o| - |F_c|| / \sum_{\text{hkl}} |F_o|$ <sup>e</sup> Calculated using MolProbity.

#### 5-3-4 LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA の相互作用解析

LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の相互作用様式を明らかにするため、複合体中のそれぞれ単体のタンパク質や複合体全体での表面電荷を計算し、静電ポテンシャルマップを作製した (Fig. 5-5A, B)。その結果、LysZ における2か所の LysW との相互作用面は正電荷を持ち、LysW 表面は全体的に負に帯電しているため、これらが静電的に相互作用していることが示唆された。実際に LysW の酸性残基が LysZ の塩基性残基とイオン結合を形成している様子がどちらの相互作用部位でも観察された (Fig. 5-5C, D)。2 つの相互作用部位の接触表面

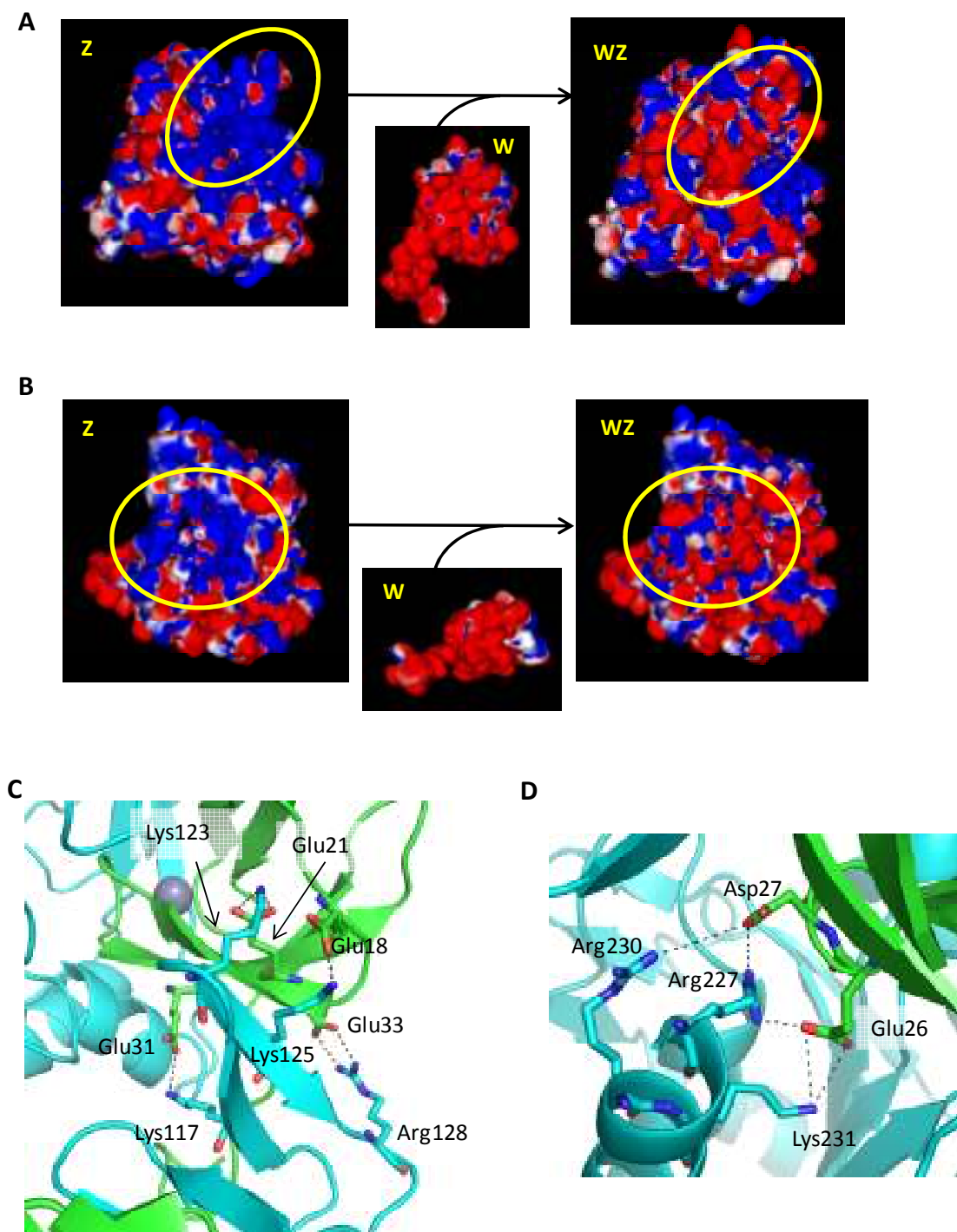


Figure 5-5 LysZとLysW- $\gamma$ -AAAの相互作用

A, B. 複合体結晶構造のLysZ及びLysW- $\gamma$ -AAAの相互作用表面を中心とした表面電荷。

C, D. LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA間のイオン結合形成残基。シアンがLysZ、緑がLysW- $\gamma$ -AAAを示す。

AとCがIR1を、BとDがにおける相互作用を示している。

積は strand  $\beta 8$  付近の IR 1 で  $4729.2 \text{ \AA}^2$ 、活性中心付近の IR 2 で  $4484.0 \text{ \AA}^2$  となっており、IR 1 の方がより広い面積で相互作用していた。

さらに、結晶構造で観察された LysZ-LysW 間の静電相互作用を熱力学的に明らかにするため、ITC によって LysZ への LysW- $\gamma$ -AAA の結合に伴う熱量変化を観察した (Fig. 5-6A)。以下に、測定結果を示す (Table 5-4)。LysZ における LysW- $\gamma$ -AAA の結合サイトが 1 ではないのは、LysW- $\gamma$ -AAA が金属を結合し、極度に酸性タンパク質であることから、そのタンパク質濃度を正確に測定できずに少なく見積もられてしまっているからだと考えている。測定から直接得られた結合に伴う  $\Delta H$  や  $\Delta S$  の値を用いて、 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  の関係からこれらをグラフにすると、Fig. 5-6B のようになり、LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA の結合の安定化にはエンタルピーの寄与が大きいことが分かる。エンタルピーは主にイオン結合や水素結合などの形成に伴うエネルギー項を表すことから、この 2 つのタンパク質間の結合が結晶構造で観察されたように静電相互作用によることが ITC によっても実証されたといえる。

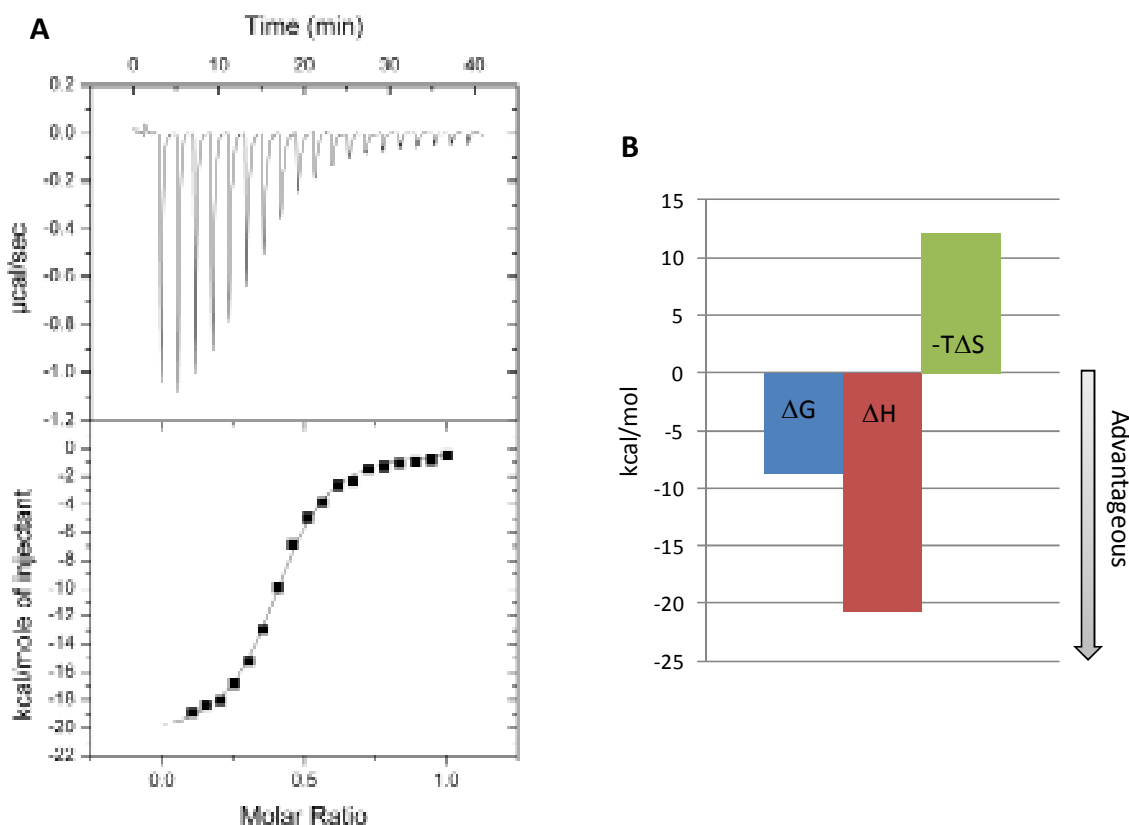


Figure 5-6 ITC 測定

- A. LysZ に対する LysW- $\gamma$ -AAA の結合に伴う熱量変化。
- B. ITC 測定により得られた熱量の相関。

Table 5-4 ITC 測定により得られたデータ

	LysW- $\gamma$ -AAA
N(結合サイト数)	0.402
$K_a$ (結合定数)	$4.69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
$K_d$ (解離定数)	2.13 $\mu\text{M}$
$\Delta H$	-20.8 kcal/mol
$\Delta S$	-36.4 cal/mol/deg

### 5-3-5 LysZ 活性の検出と反応産物の同定

LysZ は LysX の反応によって生成する LysW- $\gamma$ -AAA と ATP を基質として AAA の側鎖のカルボキシル基をリン酸化して LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate を生成する反応を触媒すると考えられる (Fig. 5-7A)。LysZ は AK と同様の反応を行うため、AK と同様のヒドロキサム酸錯体を用いた活性測定が利用できるかと考えたが、LysW というタンパク質を基質とするため、塩化鉄を加えると沈殿してしまい吸光度測定ができなかった。また、LysZ の次の反応を担う LysY が NADPH 依存的に還元反応を行うため、カップリング反応により 340 nm の吸光で活性を追うことも考えたが、LysW が金属結合タンパク質であるため LysW 自身の吸光が強く活性検出は難しいと考えられた。

これまでの研究で、LysJ までの反応で生成する LysW- $\gamma$ -Lys の Tricine SDS-PAGE 上でのバンドの位置が LysW や LysW- $\gamma$ -AAA のバンドの位置とは異なることが示されていたため、LysZ の反応産物でも同じようなバンドシフトが生じ、それを利用した活性測定ができないかを考えた。しかしながら、LysZ 反応後の LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate ではバンドシフトが見られないことや、MS による分析を行うとその不安定性から検出できないことが分かっていた。そこで、AK の活性測定でも用いているヒドロキシルアミンを反応系に添加しておくことでリン酸化体をヒドロキサム酸誘導体化し安定性を高めることとした。反応産物を SDS-PAGE に供した (Fig. 5-7B) ところ、LysZ 反応により生じたタンパク質由来のバンドと、コントロールとして用いた反応を行っていないバンドの移動度が異なっており、LysZ 反応によって生じたバンドは LysW- $\gamma$ -AAA よりも高い位置に観察された。これらのバンドをそれぞれ切り出し、トリプシン消化後、質量分析を行った。LysW は 13 残基目及び 41 残基目に Arg 残基を有するためトリプシン消化によるペプチド断片は 3 種類生じる。AAA は LysW の C 末に結合しており、反応による分子量変化を追うため C 末側のペプチドに着目した。



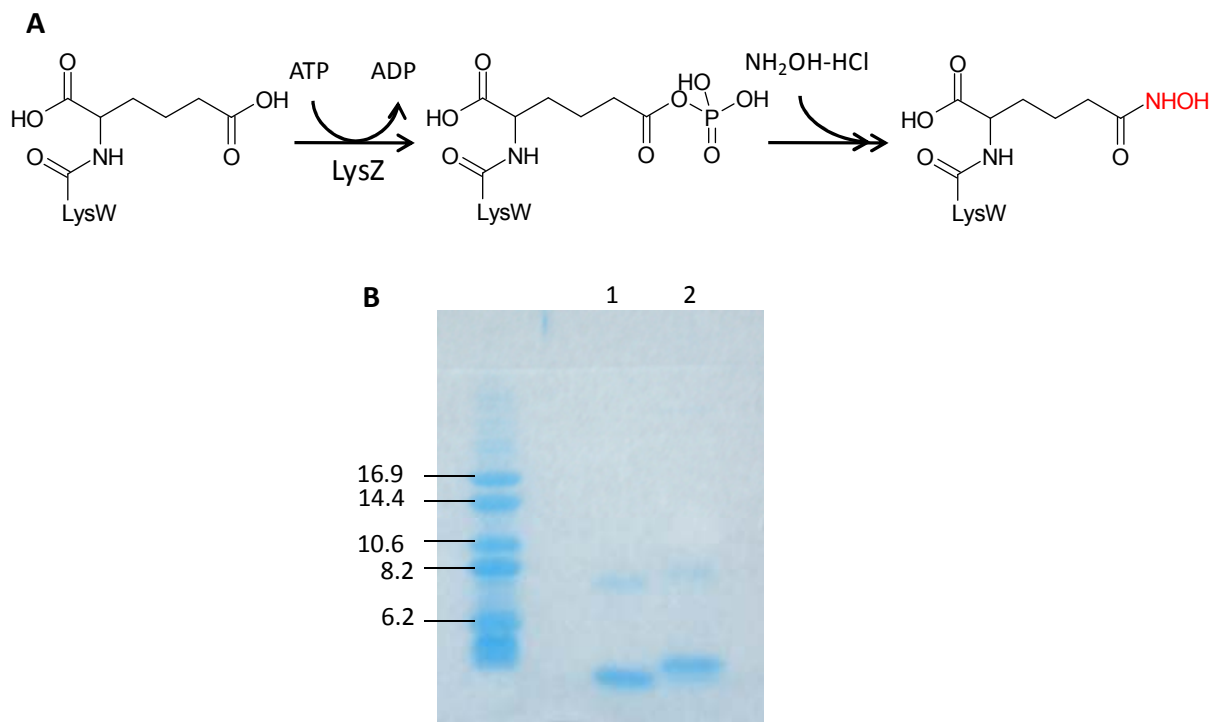


Figure 3-7 LysZ の反応産物の検出

A. LysZ の酵素反応及びヒドロキシルアミンによる誘導体化

B. LysZ の反応産物の SDS-PAGE。lane1 は LysZ 反応を行っていない LysW-γ-AAA。  
lane2 は LysZ 反応及びヒドロキサム酸化したもの。

この消化断片に対して MALDI-TOF-MS 分析を行ったところ、コントロールおよび LysZ 反応産物からは、それぞれ総分子量 1614.7、1629.7 に相当するピークが検出された (Fig. 5-8A, C)。これらは、LysW の C 末 13 残基に AAA または AAA の側鎖にヒドロキシルアミンが結合したものが 1 残基付加したペプチドの分子量(それぞれ理論値、1614.68、1629.69)に等しい。さらに、MS/MS 分析からもこのペプチドが LysW の C 末側の 13 残基と AAA または AAA 誘導体由来することが示された (Fig. 5-8B, D)。このことから、LysZ の反応とヒドロキシルアミンの作用により LysW- $\gamma$ -AAA とは SDS-PAGE 上で異なる位置に生じるバンドは、LysZ 反応により生じた LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate がヒドロキシルアミンによって LysW- $\gamma$ -AAA-hydroxamate に変換されたものに由来することが示された。

また、この LysW- $\gamma$ -AAA のヒドロキサム酸誘導体は Tricine SDS-PAGE 上で LysW- $\gamma$ -AAA と移動度が異なるので、これを利用して Tricine SDS-PAGE によって LysZ 活性の有無が判断できるようになった。

### 5-3-6 LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の Native PAGE による検出

LysZ および LysW- $\gamma$ -AAA の濃度を変化させて 10 mM ATP、1 mM MgSO<sub>4</sub> とともにインキュベートし、Native PAGE に供したところ、LysZ 単体や LysW- $\gamma$ -AAA 単体では見られなかったバンドが生じた (Fig. 5-9)。このバンドは 10 mM ATP と 1 mM MgSO<sub>4</sub> を添加しない条件でも見られたが、これらを添加した条件のバンドの方が量が多かった。また、AAA が付加していない LysW と LysZ を同様に Native PAGE に供してもこのようなバンドは見られなかった。このことは、LysZ と LysW の結合には LysW に AAA が付加することが必要であることを示唆している。さらに、LysZ や LysW- $\gamma$ -AAA の濃度に応じてこのバンドは濃くなることから、このバンドが LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体由来であることが示唆され、この方法を用いて LysZ 変異体における LysW- $\gamma$ -AAA との相互作用の可否を検討することにした。

### 5-3-7 LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 相互作用に関する変異体解析

LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA の結晶構造において、LysW- $\gamma$ -AAA との相互作用部位が LysZ 上に 2 か所存在した。このうちどちらが LysZ の活性発現に重要な相互作用であるかを明らかにするため、LysZ 上の相互作用部位における塩基性アミノ酸を Ala や Glu に置換した変異体を作製し、LysZ 活性を Tricine SDS-PAGE を用いて測定した。またそれらの変異による LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA 間の相互作用に対する影響を調べるため、Native PAGE を行った。

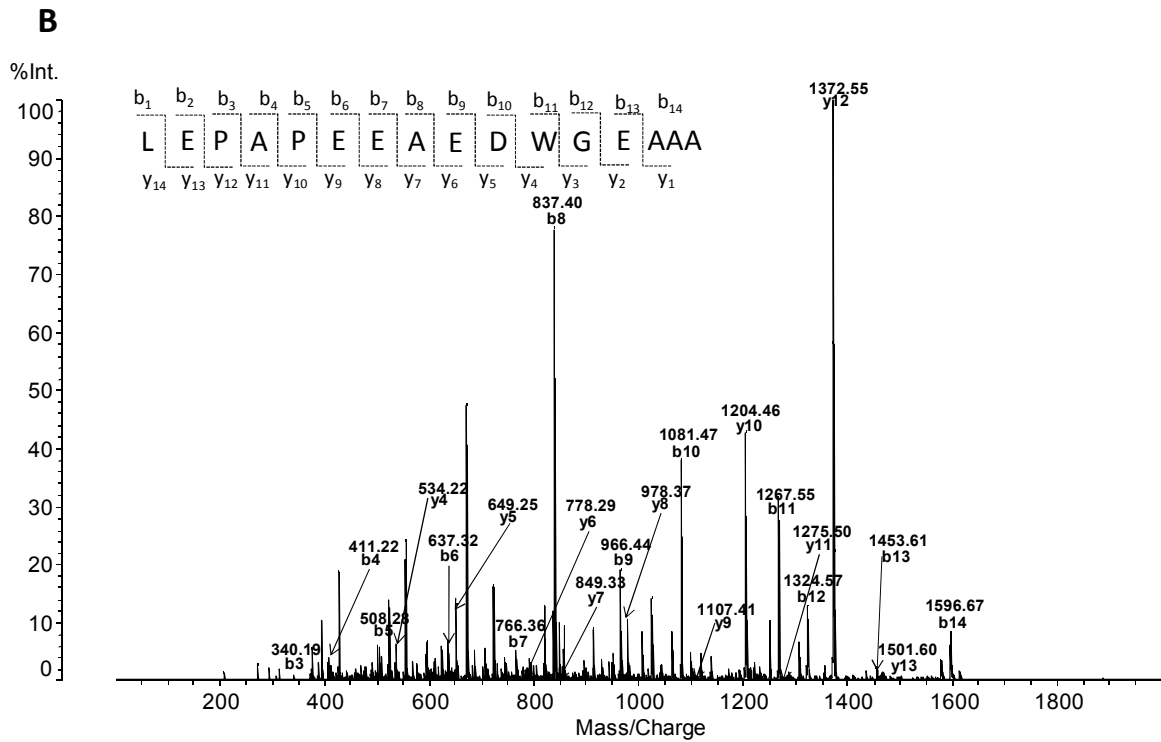
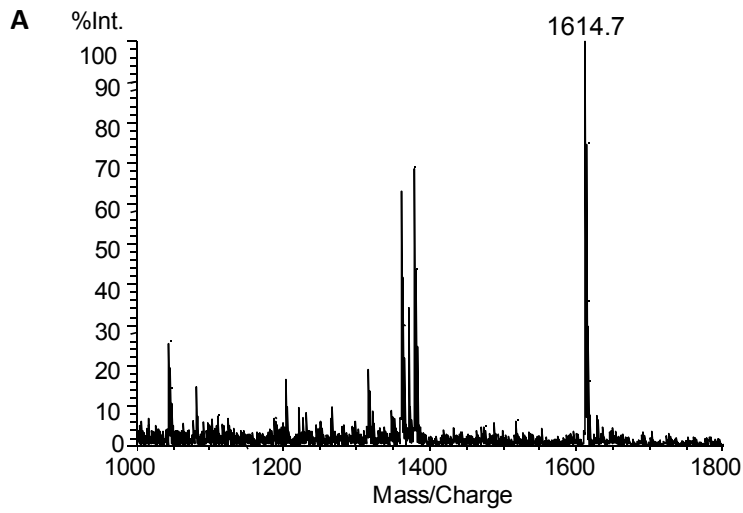


Figure 5-8A, B コントロール (LysW- $\gamma$ -AAA) の MS スペクトル

A. TOF-MS スペクトル

B. MS/MS スペクトル

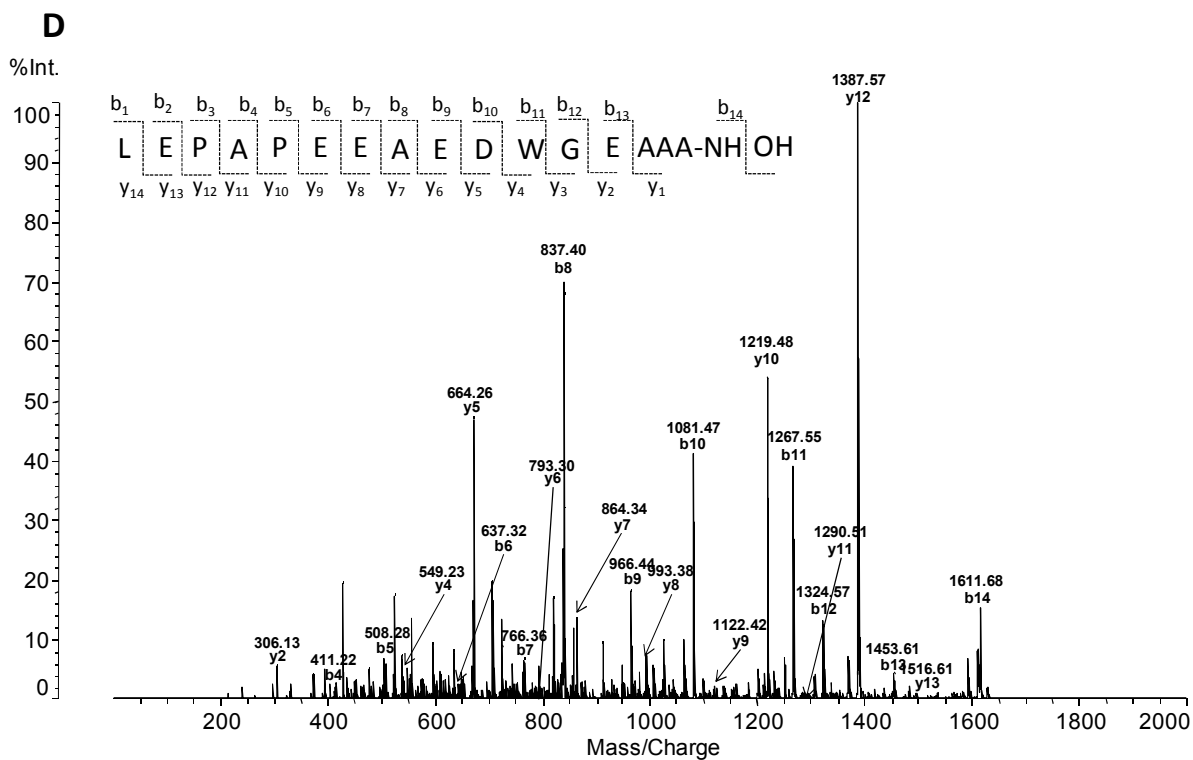
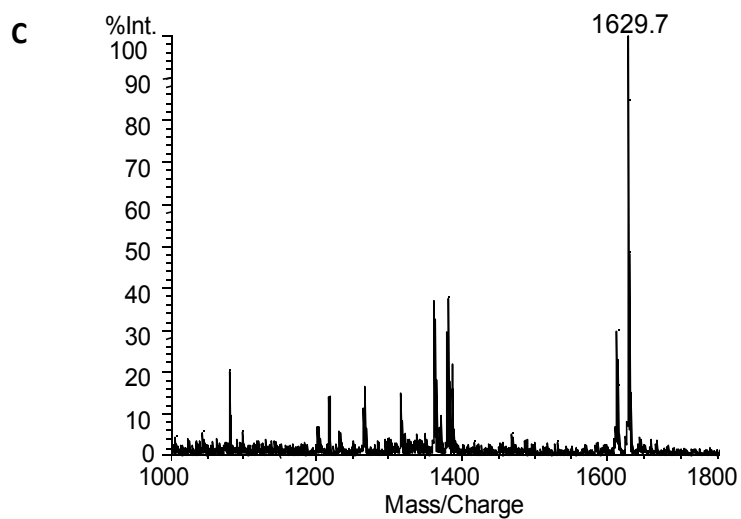


Figure 5-8C, D LysZ 反応産物の MS スペクトル

C. TOF/MS スペクトル

D. MS/MS スペクトル

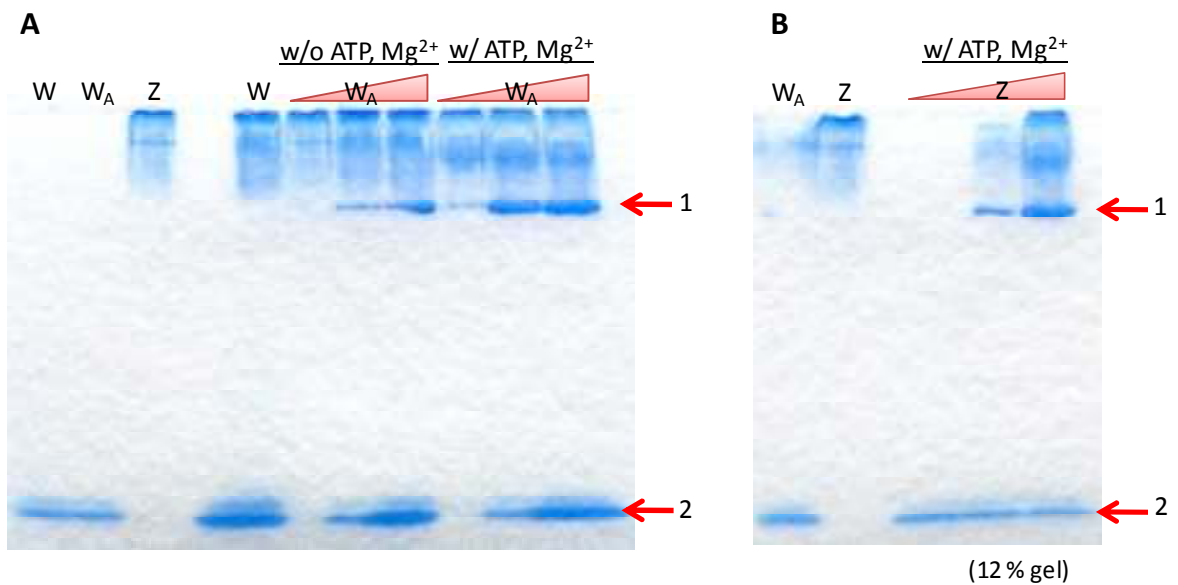


Figure 5-9 Native PAGE による LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の検出

A. LysZ の濃度を 1 mg/ml に固定し、LysW- $\gamma$ -AAA を 0.02、0.2、2 mg/ml にしたサンプルの Native PAGE。ATP や  $Mg^{2+}$  を添加しない条件 (w/o ATP,  $Mg^{2+}$ ) と添加した条件 (w/ ATP,  $Mg^{2+}$ ) で行った。

B. LysW- $\gamma$ -AAA の濃度を 0.2 mg/ml に固定し、LysZ の濃度を 0.01、0.1、1 mg/ml にしたサンプルの Native PAGE。

赤い矢印で示したバンドはそれぞれ 1; LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体、2; LysW- $\gamma$ -AAA または LysW を示す。

### (a) 活性測定

LysZ は LysW- $\gamma$ -AAA との複合体結晶構造中で(i) strand  $\beta$ 8 を中心とする部分 (IR 1) と、(ii) helix  $\alpha$ 8 の N 末を中心とする領域 (IR 2) の 2 か所で LysW- $\gamma$ -AAA と相互作用している (Fig. 5-3A, B)。これらの部位における LysW- $\gamma$ -AAA とイオン結合を形成している残基 ((i) Lys117, Lys123, Lys125, Arg128, (ii) Arg227, Arg230, Lys231) を Glu に置換する変異を LysZ に導入し、活性を調べた。また、相互作用している残基に加えて LysW- $\gamma$ -AAA の C 末が結合すると予測された部位における塩基性アミノ酸 ((iii) His57, Arg111, Arg112, Lys113) を Ala や Glu に置換する変異や活性中心内部へと入り込む通路周辺のアミノ酸 ((iv) Ser63, Thr132, Thr134) を嵩高い Tyr に置換した変異体を作製した。さらに、LysZ ホモログである ArgB (NAGK) でリン酸化を受ける基質 *N*-アセチルグルタミン酸のカルボキシル基の結合に関与する Arg 残基に相当する Arg64 や触媒残基の Lys5 を Ala に置換した変異体や特に相互作用や活性に関わらないと考えられる Lys26 の Ala への変異体についても測定を行った。

LysZ 変異体の活性はヒドロキシルアミンを添加した反応溶液で行い、反応後のサンプルを Tricine SDS-PAGE に供し、その泳動パターンを比較した (Fig. 5-10A)。その結果、コントロールとして用いた K26A 変異体以外のすべての変異体で LysZ 活性の低下が見られた。また、これらのバンドの濃さからそれぞれの変異体の経時的な反応の進行具合を数値化した (Fig. 5-10B)。

### (b) Native PAGE による複合体形成解析

上記の変異体のうち、LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 間相互作用に関わるアミノ酸残基の変異体について LysW- $\gamma$ -AAA と複合体を形成するかどうかを Native PAGE を用いて調べた。Fig. 5-11 に各変異体の Native PAGE 泳動像を示す。結果として、LysW との相互作用残基である LysZ の helix  $\alpha$ 8 の N 末付近 (IR 2) のアミノ酸残基の変異体では Arg230 を除いて複合体形成が見られたのに対し、strand  $\beta$ 8 付近 (IR 1) のアミノ酸残基の変異体では複合体に由来するバンドは観察されなかった。

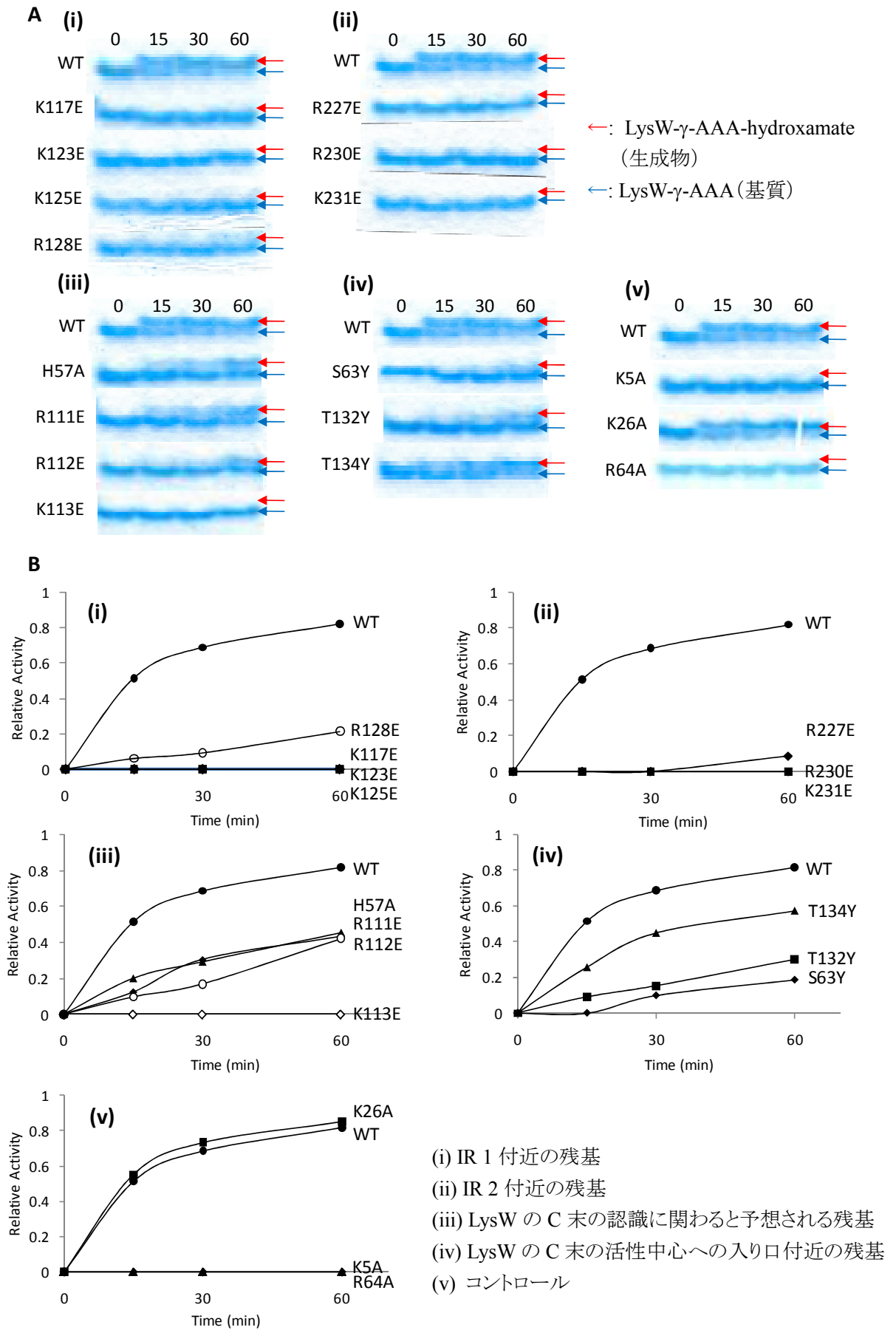


Figure 5-10 変異体の活性測定

A. Tricine SDS-PAGE の泳動像 B. ImageJ による解析結果

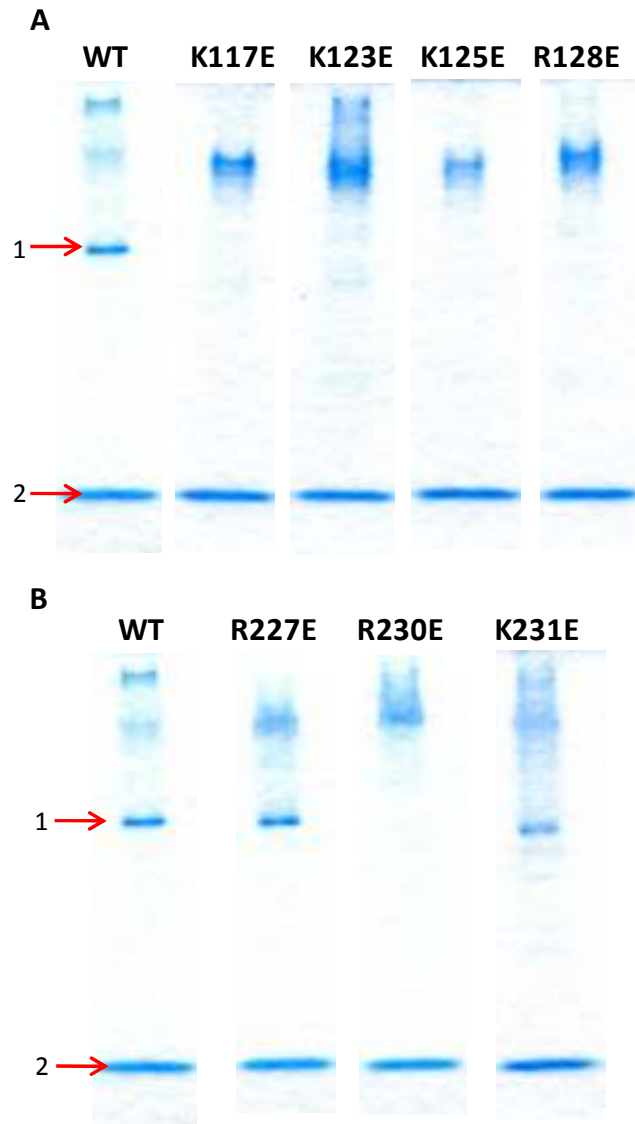


Figure 5-11 LysZ 変異体の Native PAGE による LysW- $\gamma$ -AAA との相互作用解析

A. 相互作用部位 IR 1 付近の変異体

B. 相互作用部位 IR 2 付近の変異体

矢印で示したバンドはそれぞれ 1; LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体、2; LysW- $\gamma$ -AAA を示す。



### 5-3-8 LysW とリジン生合成酵素との相互作用解析

Native PAGE により LysW- $\gamma$ -AAA と LysZ の相互作用が観察されたことから、LysZ 以降のリジン生合成経路に関わる酵素 (LysY、LysJ) と LysW が付加した基質との相互作用を同様に Native PAGE により観察した。LysY や LysJ の基質となる LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate や LysW- $\gamma$ -AAA-semialdehyde は LysW- $\gamma$ -AAA との LysZ の反応や LysY の反応により段階的に調製した。また、コントロールとして LysW- $\gamma$ -AAA とそれぞれの酵素との相互作用があるかどうかを調べた。各反応液の Native PAGE を Fig. 5-10A に示す。また、これら Native PAGE に供したサンプルの組成を Tricine SDS-PAGE でも確認した (Fig. 5-10B)。各レーンの組成を Table 5-5 に示す。ここでの 1 段階目から 3 段階目は、多段階の反応を行う際の順番を示しており、各段階で 1 時間反応を行い、その後次の酵素や補酵素を添加しさらに反応を行っていった。

まず、生合成経路の順に反応を追っていくと、LysZ と LysW- $\gamma$ -AAA の反応後に、LysY のみを添加しても LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA (または AAA-phosphate) 複合体由来のバンドは消失しない (Fig. 5-10A の lane 2) が、その後 LysY の補酵素である NADPH を加えるとそのバンドは消失し、別の LysY/LysW- $\gamma$ -AAA の相互作用 (共有結合) したもの、または LysY/LysW- $\gamma$ -AAA-semialdehyde 複合体由来と考えられるバンドがうっすらと現れる (Fig. 5-10A の lane 6)。この LysY のみを加えた状態では SDS-PAGE 上で LysY/LysW- $\gamma$ -AAA の共有結合複合体由来のバンドが観察される (Fig. 5-10B の lane 2)。その後、LysJ を添加すると、このバンドの上にもう一本のバンドが見られ、これは LysJ/LysW- $\gamma$ -AAA-semialdehyde 複合体由来と考えられる (Fig. 5-10A の lane 7)。さらに LysJ の基質、補酵素である Glu と PLP を加えるとこれら 2 本のバンドは薄くなり LysJ 単体由来のバンドが濃くなることから、LysW- $\gamma$ -Lys が生成すると LysJ から離れやすくなると考えられる (Fig. 5-10A の lane 8)。

生合成経路の順番とは異なる順番で添加したサンプルに着目すると、興味深いことに、LysZ 反応後に LysJ 単体または LysY と LysJ (いずれも補酵素や基質は添加しない) を加えると LysJ/LysW- $\gamma$ -AAA (または AAA-phosphate) 複合体またはこれに加えて LysZ が結合した複合体に由来すると考えられる 2 本のバンドが生じる (Fig. 5-10A の lane 3, 4)。これらのサンプルは Tricine SDS-PAGE 上で LysZ、LysJ よりも高分子量側にバンドが見られ (Fig. 5-10B の lane 3, 4)、SDS や還元剤存在下であることから、共有結合したものだと考えられる。分子量から考えると LysJ と LysW- $\gamma$ -AAA (誘導体) が共有結合したものとするのが妥当である。また、lane 4 の組成でインキュベートした後に LysY、LysJ の補酵素 (NADPH、PLP、Glu) を添

加し再びインキュベートしても、LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体由来のバンドは消失したものの、この LysJ/LysW- $\gamma$ -AAA (誘導体) 由来と考えられるバンドは消失しなかった (Fig. 5-10A, B の lane 5)。

Table 5-5 反応溶液組成

lane	1段階目	2段階目	3段階目
1	WAAA, Z, MgATP		
2	WAAA, Z, MgATP	Y	
3	WAAA, Z, MgATP	J	
4	WAAA, Z, MgATP	Y, J	
5	WAAA, Z, MgATP	Y, J	NADPH, PLP, Glu
6	WAAA, Z, MgATP	Y, NADPH	
7	WAAA, Z, MgATP	Y, NADPH	J
8	WAAA, Z, MgATP	Y, NADPH	J, PLP, Glu

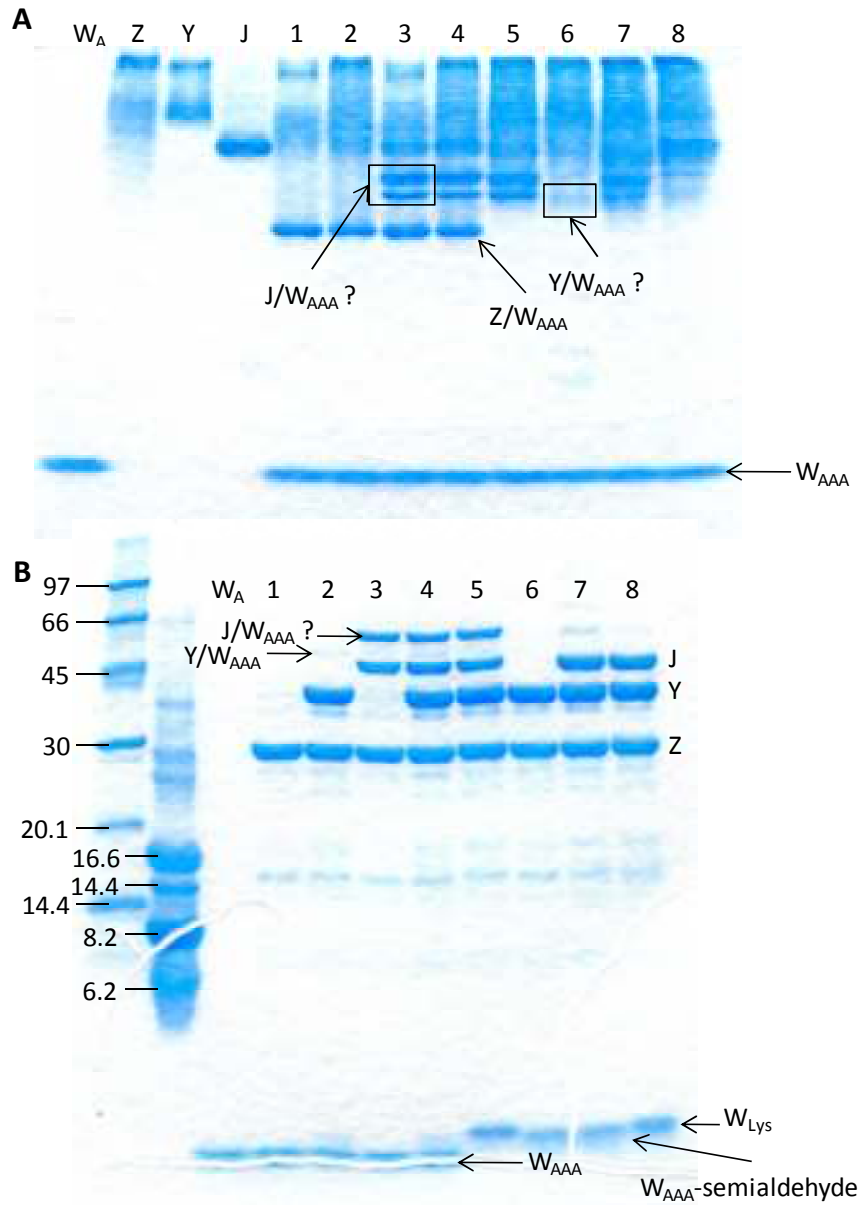


Figure 5-12 LysW と各生合成酵素の相互作用

A. LysZ、LysY、LysJ の各反応段階における Native PAGE

B. A で Native PAGE に用いたサンプルの Tricine SDS-PAGE

各レーンの組成 (A, B 共通)

1. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP
2. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → Y
3. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → J
4. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → Y, J
5. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → Y, J → NADPH, PLP, Glu
6. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → Y, NADPH
7. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → Y, NADPH → J
8. W<sub>AAA</sub>, Z, MgATP → Y, NADPH → J, PLP, Glu

図中の略語

W<sub>AAA</sub>: LysW-γ-AAA

W<sub>Lys</sub>: LysW-γ-Lys

W<sub>AAA</sub>-semialdehyde: LysW-γ-AAA  
semialdehyde

Z/W<sub>AAA</sub>: LysZ/LysW-γ-AAA 複合体

Y/W<sub>AAA</sub>: LysY/LysW-γ-AAA 複合体

J/W<sub>AAA</sub>: LysJ/LysW-γ-AAA 複合体

## 5-4 考察

### 5-4-1 Zinc finger タンパク質として新しい fold を持つ LysW

*T. thermophilus* のリジン生合成経路において重要な役割をもつ LysW の結晶構造を決定した。この構造を Dali サーバーによって類似構造をサーチしたところ、Zinc finger タンパク質のうち、Zinc ribbon サブファミリー[114]に属する液泡輸送に関する ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) -II の Zinc finger ドメインの構造 (PDB ID: 2J9U) [115] によく似ているという結果となった (Z score; 2.9) (Fig. 5-13A)。しかしながら、LysW では C 末の strand  $\beta 5$  が strand  $\beta 4$  の隣に位置し、 $\beta 3$  および  $\beta 4$  と  $\beta$  sheet を形成しているのに対し、ESCRT の構造では、C 末の strand  $\beta 5$  は N 末の strand  $\beta 1$  の隣に位置し  $\beta 1$  および  $\beta 2$  と  $\beta$  sheet を形成しており、 $\beta$  sheet を形成する相手に違いが見られた (Fig. 5-13B)。このことから、LysW の fold が Zinc finger タンパク質として新規な fold であることが示された。

### 5-4-2 LysZ の構造比較

本章では LysZ の結晶構造を LysW- $\gamma$ -AAA や ADP との複合体として決定することに成功した。以前に他のグループによって決定されている *T. thermophilus* HB8 由来のアポ型の LysZ の結晶構造を含めて構造比較を行った。LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体中の LysZ と ADP 複合体の LysZ を比較するとその RMSD は 1.04 Å であり、LysW- $\gamma$ -AAA との複合体中では disorder して見られなかった部分が ADP 複合体中では見えていた (Fig. 5-14A)。さらに、N-lobe を覆うように位置している strand  $\beta 3$ - $\beta 4$  や  $\beta 7$ - $\beta 8$  で構成される  $\beta$  sheet 領域や、helix  $\alpha 7$  から  $\alpha 8$  の部分に大きな構造の違いが見られ、ADP 複合体の方が閉じた構造をとっていた。他のアミノ酸キナーゼでは、ATP 結合によって閉じた活性型構造となる induced fit 機構が存在するといわれている。*T. thermophilus* HB8 由来のアポ型 LysZ と ADP 結合型 LysZ の間でも、この領域に違いが見られたため、LysZ においても ATP 結合により N-lobe と C-lobe の間が閉じた構造が安定化すると考えられる。

一方で、LysW 結合型と ADP 型の間での  $\beta$  sheet 領域の構造の違いは、LysW 結合型は LysW の結合していないアポ型構造とほぼ同じ構造を取っているため (Fig. 5-14B)、ADP 結合によるものと考えられる。LysW を結合した LysZ では  $\beta$  sheet 領域が明瞭な電子見度を与えるのに対し、アポ型 LysZ のダイマー構造において、この  $\beta$  sheet 領域が disorder していることから、LysW の結合がこの領域を安定化していると考えられる。ADP の結合により  $\beta$  sheet

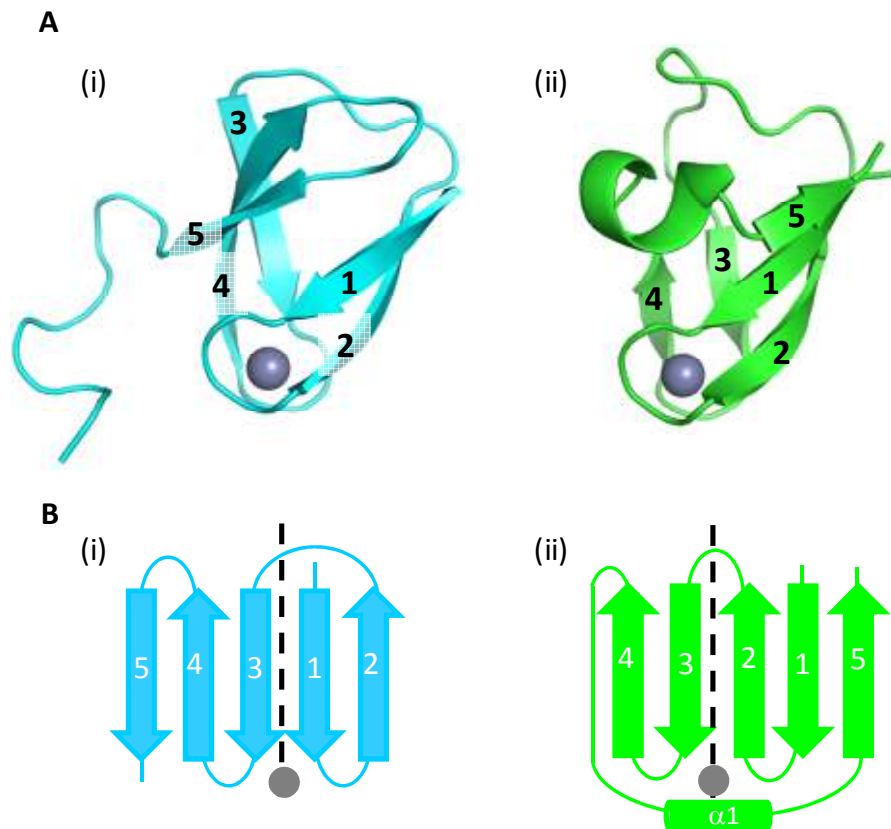


Figure 5-13 新規 Zinc finger タンパク質としての LysW  
 A. (i) LysW の結晶構造。(ii) ESCRT-II の Zinc finger ドメイン

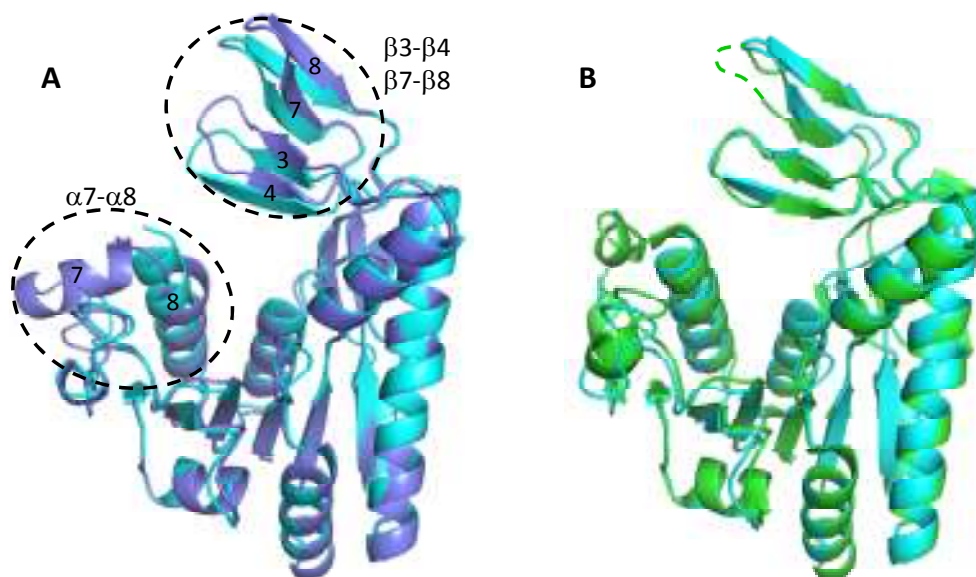


Figure 5-14 LysZ 構造の比較  
 A. LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体中の LysZ(シアン)と ADP 複合体中の LysZ(青)の重ね合わせ  
 B. LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体中の LysZ(シアン)と *T. thermophilus* HB8 のアポ型の LysZ(緑)の重ね合わせ

領域が外に開いた様な構造を取ることから、この動きによって LysW の C 末が活性中心に入りやすくなるとも考えられ、LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の構造には ATP が結合していなかったために、結晶構造中で LysW の C 末が活性中心へと向いていなかったのかもしれない。

また、ADP 結合サイトを、LysZ のホモログである *E. coli* 由来 ArgB (NAGK) の AMP-PNP 結合型構造 (PDB ID; 1GS5) と比較した (Fig. 5-15A, B)。その結果、ArgB における AMP-PNP の  $\beta$ -及び  $\gamma$ -リン酸のところ、LysZ では ADP の  $\alpha$ -及び  $\beta$ -リン酸が結合しており、リン酸基一つ分 N-lobe 側にずれた状態で結合していた。なぜこのような結合となってしまうのかはわからないが、少なくとも本来の活性型状態での結合とは異なると考えられる。さらに、ArgB の閉じた構造に比べて LysZ は幾分開いており、ATP や AMP-PNP がしっかりと結合をすればより LysW- $\gamma$ -AAA の結合に適した構造をとるかもしれない。

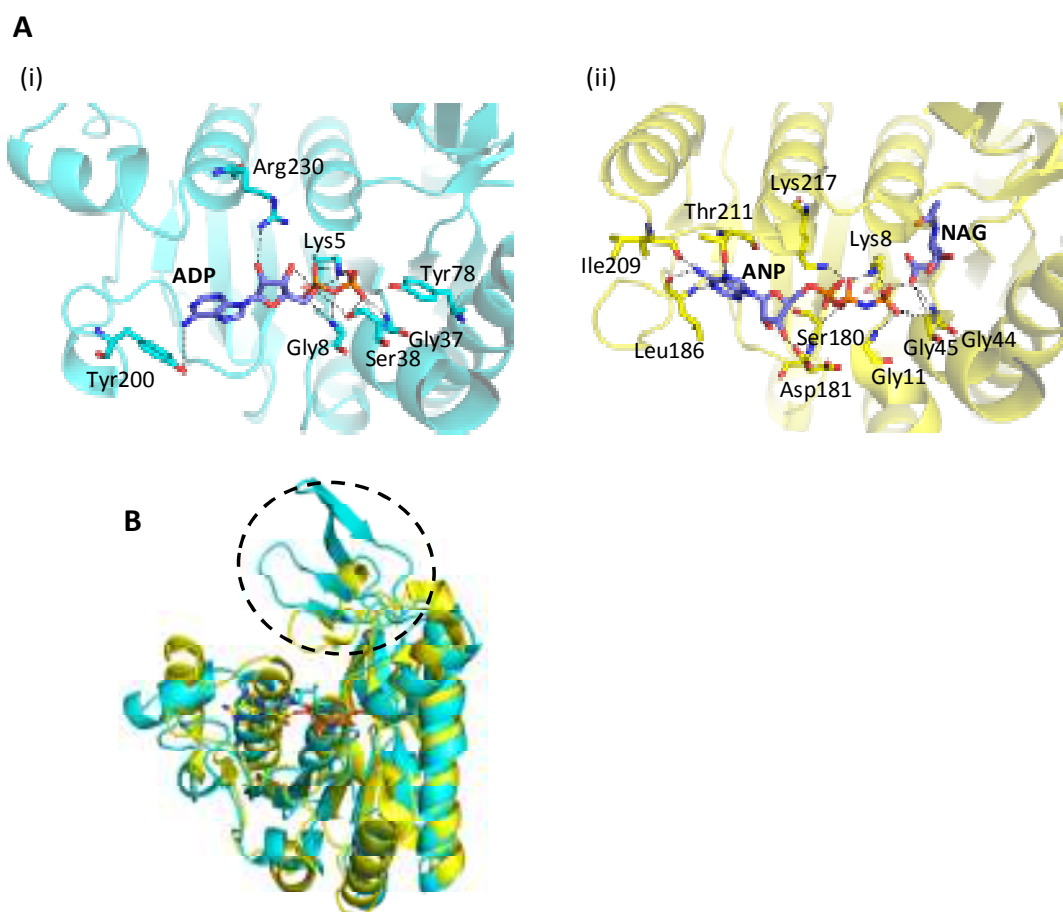


Figure 5-15 ArgB との ATP 結合サイトの比較

- A. (i) LysZ の ADP サイト。ADP を青、ADP の結合に関わる残基をシアンスティックモデルで示す。(ii) ArgB の AMP-PNP サイト。AMP-PNP (ANP) と *N*-アセチルグルタミン酸 (NAG) を青、結合に関わる残基を黄色のスティックモデルで示す。
- B. ArgB (黄) と LysZ-ADP (シアン) の重ね合わせ

#### 5-4-3 LysZ における LysW- $\gamma$ -AAA の相互作用部位

LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の結晶構造ではその相互作用部位として考えられる場所が 2 か所存在した。表面電荷の計算から、LysZ における 2 か所の相互作用部位 (IR 1: strand  $\beta$ 8 付近と IR 2: helix  $\alpha$ 8 の N 末付近) はどちらも塩基性領域となっており、酸性タンパク質である LysW を結合するには適していた。変異体の活性測定からは、このどちらの部位を改変しても活性の低下が見られた。しかしながら、Native PAGE の結果からは IR 2 に変異を導入した変異酵素 (R227E, R230E, K231E) のうち R227E と K231E では LysW- $\gamma$ -AAA との複合体形成が検出されたことから、こちらの相互作用部位は LysZ の相互作用には重要ではないことが示唆された。この残基が存在する helix  $\alpha$ 8 の N 末は ADP 結合部位周辺に存在し、その結合に伴い構造変化をしていることから、これらの変異によって ADP の結合や活性型構造の安定化に支障が生じるために、活性が低下したと考えられる。一方、IR 1 の LysW との相互作用残基に変異を導入した変異型 LysZ は活性が低下するだけでなく、LysW- $\gamma$ -AAA との相互作用形成ができなくなることから、こちらが LysW- $\gamma$ -AAA との相互作用に重要な部位であると考えられる。これは IR 1 の方が LysW との接触表面積が広いことから支持される。さらに、アルギニン生合成経路において LysZ と同様の反応を行う ArgB との配列及び構造比較から、strand  $\beta$ 8 を含む、N-lobe の基質結合部位を覆うように存在する strand  $\beta$ 3- $\beta$ 4 と strand  $\beta$ 7- $\beta$ 8 の  $\beta$  sheet 領域に違いが存在している (Fig. 5-16A, Fig. 5-15B 点線で囲った部分)。これら 2 つの酵素は ArgB がグルタミン酸の  $\alpha$ -アミノ基がアセチル基によって保護された N-アセチルグルタミン酸を基質とするのに対し、LysZ がグルタミン酸よりも一炭素鎖長い AAA の  $\alpha$ -アミノ基が LysW によって保護された LysW- $\gamma$ -AAA を基質とする。この配列上の gap の存在が 2 つの酵素の基質認識の違いを担っているとも考えられ、LysW が LysZ のこの  $\beta$  sheet 領域に結合することが支持される。さらに、この  $\beta$  sheet 領域などの N-lobe の基質結合部位を覆う部分は AAK family の酵素において構造多様性があり (Fig. 5-16B)、基質認識を担っていると考えられている[39]ことから、LysZ における LysW- $\gamma$ -AAA の相互作用部位がこの  $\beta$  sheet 領域であることが支持される。

#### 5-4-4 LysW- $\gamma$ -AAA の C 末の結合部位

LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA 複合体の結晶構造では ATP が結合していないせいか LysW の C 末は LysZ の活性中心からは遠いところに位置していた。この C 末の結合部位を予測するため、LysZ の外部から活性中心に向かう空隙を計算した (Fig. 5-17A)。この空隙を LysW の C 末

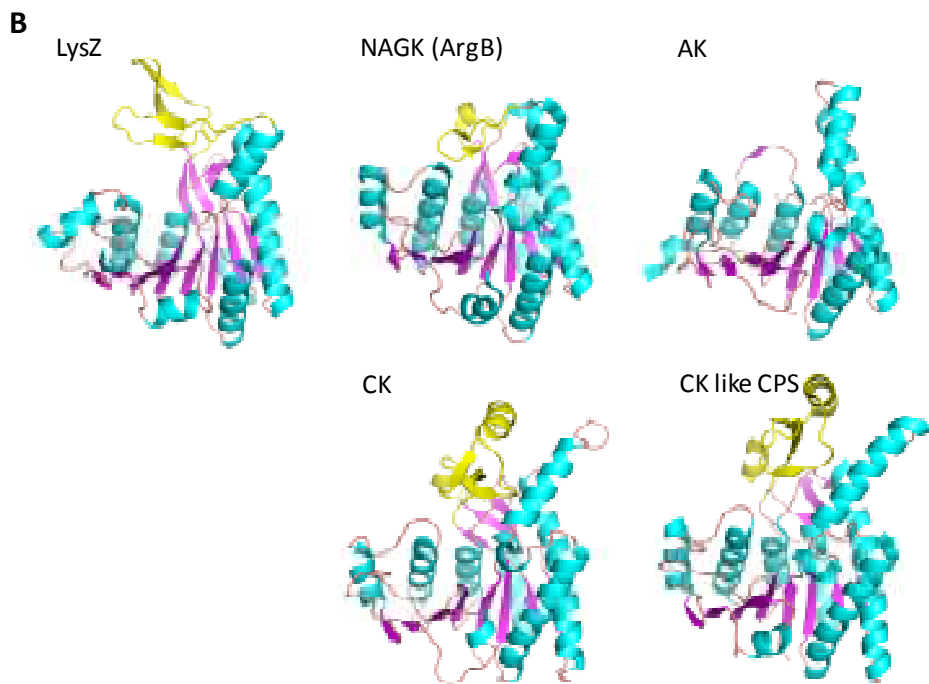
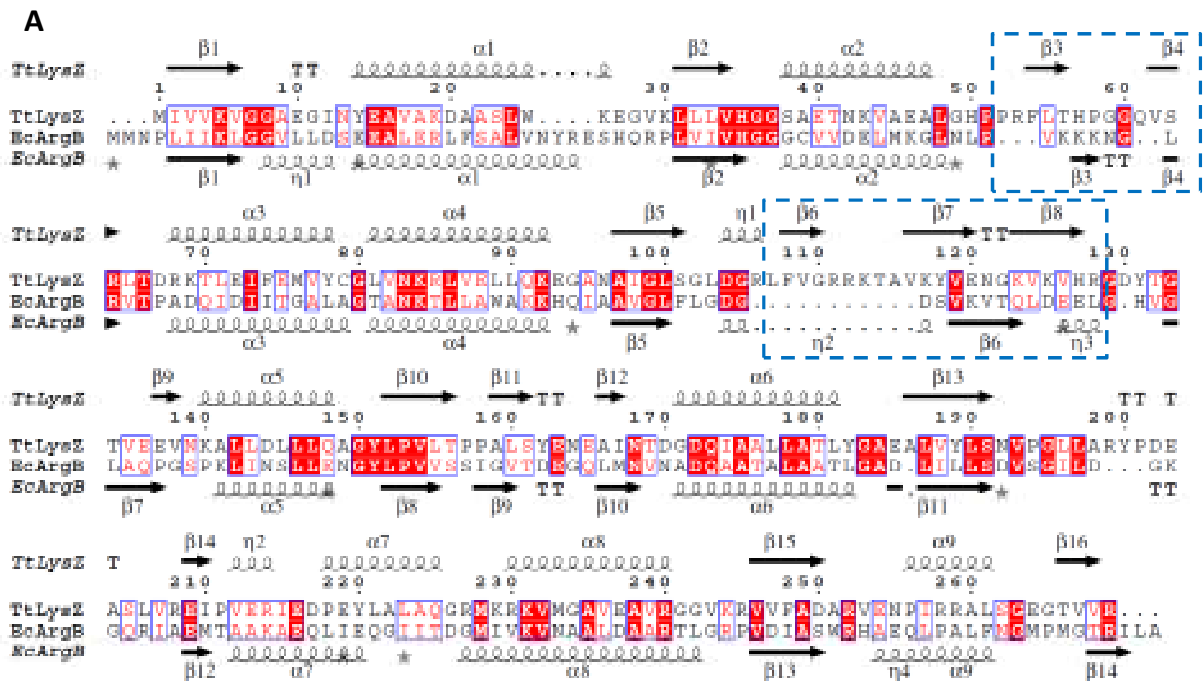


Figure 5-16 LysZ におけるβ sheet 領域の役割

A. LysZ と *E. coli* ArgB のアミノ酸配列アラインメント。構造の異なる部分を青の点線で囲った。

B. 他のアミノ酸キナーゼとの比較。LysZ のβ sheet 領域に相当する部分を黄色で示す。AK; aspartate kinase, CK; carbamate kinase, CK like CPS; carbamoyl phosphate synthetase



が通って活性中心に到達するには、IR 2 に結合した LysW からであると、距離の問題から LysW の globular domain を構成する C 末の strand  $\beta 5$  が  $\beta$  sheet の構成因子からは剥がれて、構造を変化させなければ届かないことから、LysW- $\gamma$ -AAA の LysZ への結合部位は  $\beta$  sheet 領域であることが支持される。また、同時期に当研究室で決定された *T. thermophilus* と同様のリジン生合成系をアルギニン生合成にも用いる *Sulfolobus tokodaii* 由来の ArgX と LysW の活性型複合体構造 (StArgX/LysW) (平成 22 年度 大内拓也修士論文) における LysW の構造を重ね合わせると、 $\beta$  sheet 領域に相互作用した LysW への重ね合わせにより、その C 末端が LysZ の活性中心に向かうことから、予測された C 末の経路がもっともらしいことが支持された (Fig. 5-17B)。

StLysW の構造などを参考に LysW の C 末の loop を LysZ の活性中心へと結合させたモデル構造を作製した (Fig. 5-17C)。その結果、LysW の C 末端に高度に保存された酸性アミノ酸 (Glu50、Asp51、Glu54) 付近には LysZ の塩基性アミノ酸が存在していた (His57、Arg111、Arg112、Lys113、Lys117、Arg230)。これらのアミノ酸残基の変異体では程度の差はあるが活性が低下しており、特にモデルで LysW の C 末の Glu50 とイオン結合している Lys113 の変異体では活性が完全に低下していることから、この C 末の結合モデルの妥当性が示された。今後、LysW の C 末 10 アミノ酸程度のペプチドを用いた結晶化や新たな結晶化条件の探索によって LysW- $\gamma$ -AAA の C 末と ATP またはそのアナログ化合物が活性中心に結合した活性型の結晶構造を決定していくことで、より詳細な基質認識機構が明らかになると考えられる。

#### 5-4-5 *T. thermophilus* リジン生合成系における LysW のキャリアタンパク質としての役割

本章では LysW- $\gamma$ -AAA と LysZ の相互作用以外にもその他のリジン生合成の後半の経路に関わる酵素と LysW が結合した基質などとの間に相互作用があることを Native PAGE によって示した。現時点では、Native PAGE における複合体由来であると考えられるバンドが何に由来するかははっきりと同定できておらず、今後バンドの MS 分析や二次元電気泳動などによって解析する必要があると考えている。各段階の酵素反応によってそのバンド出現パターンが異なることから、LysW が各酵素と相互作用しながら様々な複合体を形成し、反応を進めていることが示唆される。脂肪酸合成酵素のようにキャリアタンパク質 LysW を介した Lys 生合成酵素の巨大複合体を形成する可能性も考えられるが、そのような相互作用の検出には至っていない。しかしながら、興味深いことに、LysZ では 2 か所において LysW と相

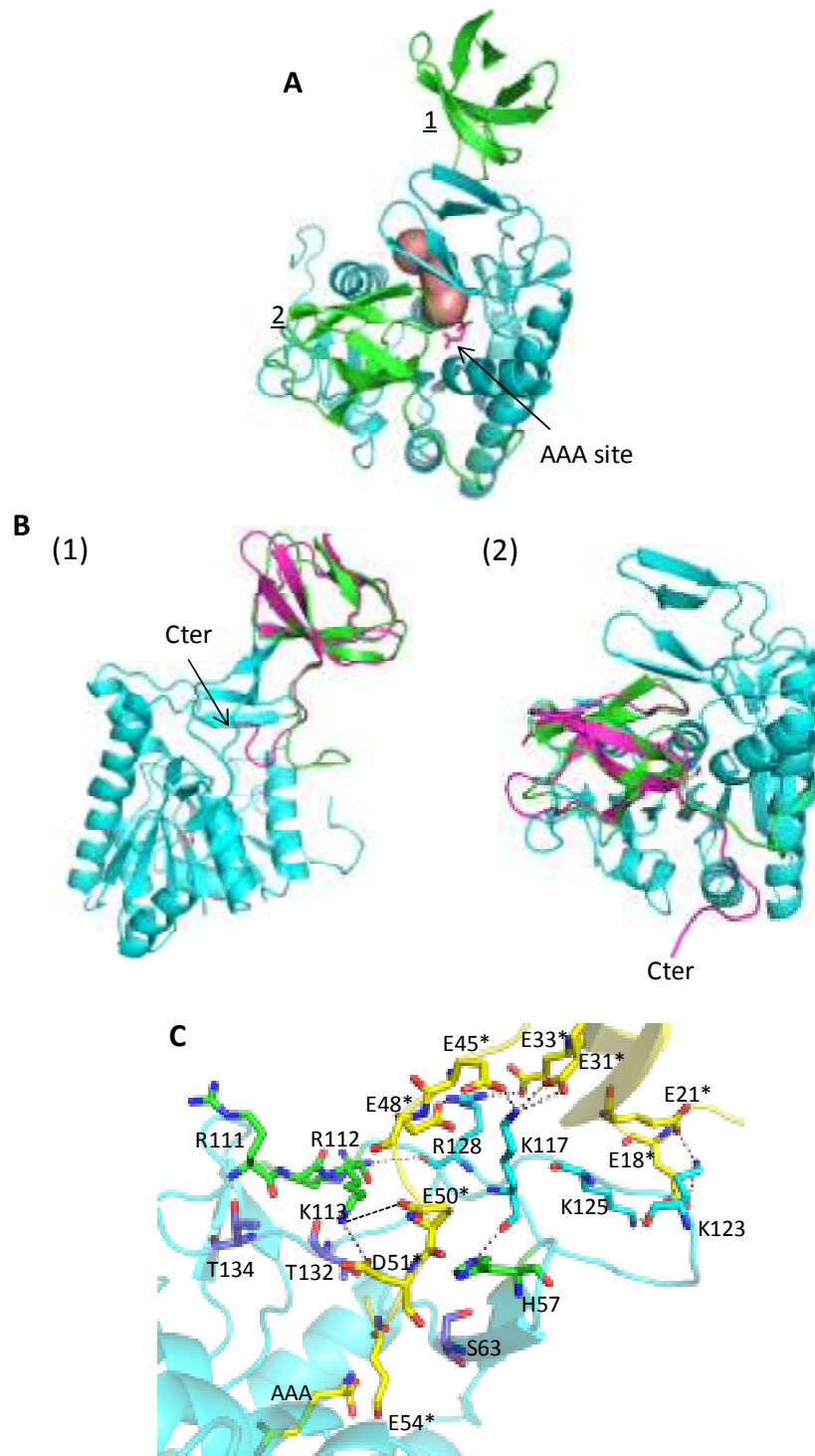


Figure 5-17 LysW- $\gamma$ -AAA の C 末の結合部位

- A. Caver によって計算されたキャビティ(ピンク)。LysZ はシアン、LysW- $\gamma$ -AAA は緑で示す。
- B. StLysW の重ね合わせ。StLysW はマゼンタで示す。(1); strand  $\beta$ 8 付近で相互作用している LysW。(2); 活性中心付近で相互作用している LysW。
- C. LysW の C 末のモデル構造とその相互作用残基。黄; LysW- $\gamma$ -AAA、シアン; LysZ、緑; 相互作用に関わるとして変異を導入した残基、青; C 末の入り口付近に存在する残基

相互作用部位が可能であることや、LysJ が恐らく LysW- $\gamma$ -AAA または LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate との共有結合を介した複合体を形成していることが明らかになっている。このような、個々の酵素活性には意味のない相互作用がリジン生合成マシナリーとしてのキャリアタンパク質 LysW を介しての効率的なリジン生合成に寄与している可能性が考えられる。また、LysJ と LysW- $\gamma$ -AAA または LysW- $\gamma$ -AAA-phosphate との共有結合複合体はその後、LysY や LysJ の基質や補酵素を添加し反応を進めても解消されないことから、LysJ が本来の aminotransferase としての反応以外に別の酵素活性を持つ可能性も示唆される。今後、LysY や LysJ の機能解析をはじめ、それらの基質である LysW- $\gamma$ -AAA 誘導体との複合体の結晶構造解析などを通じて、LysZ における第二の LysW 相互作用部位や LysJ による複合体形成の *in vivo* での機能を明らかにしていくことが、より詳細な LysW のキャリアタンパク質としての機能の解明につながると考えられる。

## 第六章 総括と展望

本研究ではリジンの生合成経路に着目し、異なる中間体を經由する DAP 経路と AAA 経路という 2 つの異なる経路において同様の反応を担うアミノ酸キナーゼに関して X 線結晶構造解析を中心とした様々な解析手法でそれらの制御機構と基質認識機構について明らかにした。

第二章と第三章では、グルタミン酸をはじめとしてリジン等のアミノ酸発酵に用いられる *C. glutamicum* における、リジン発酵の鍵酵素アスパラギン酸キナーゼ (AK) のリジンとスレオニンによるフィードバック阻害機構を、様々な状態での結晶構造の決定や他の生化学的、酵素学的な解析することによって明らかにした。*C. glutamicum* の AK (CgAK) は  $\alpha_2\beta_2$  構造という特徴的な四次構造をとっており、 $\alpha$  サブユニットの C 末側と、それと同一アミノ酸配列を持つ  $\beta$  サブユニットが活性制御ドメインであることが分かった。まず、この活性制御ドメインに阻害剤であるリジンやスレオニンが結合することを考え、 $\beta$  サブユニット単独での結晶構造を決定した。決定された  $\beta$  サブユニットのダイマー構造にはスレオニンのみが結合しており、このスレオニンの結合が  $\beta$  サブユニットのダイマー化を引き起こすことを明らかにした。さらに、この活性制御ドメイン ( $\beta$  サブユニット) のスレオニンによるダイマー化が活性制御に必須であることを変異体解析から明らかにした。この構造や分子量解析から、AK のフィードバック阻害耐性株を得るのに用いられたリジンアナログである AEC 耐性変異体のうち、後の解析に用いた Ser301Phe 以外は、実際にはリジンではなくスレオニンの結合、またはそれによる活性制御ドメインのダイマー化を阻害することで阻害耐性となっていることを示した。

続いて  $\alpha_2\beta_2$  全長でのリジンとスレオニンが結合した不活性型、スレオニンのみが結合した活性型、リジンとスレオニンが結合したフィードバック阻害耐性変異酵素である Ser301Phe の結晶構造を決定した。リジンはスレオニンと同様に活性制御ドメインの ACT ドメインによって構成されるエフェクター結合ユニットに結合しており、構造比較から、スレオニン結合に続いて起こるリジン結合によって閉じた構造が安定化されることが明らかとなった。この閉じた構造の安定化においては  $\alpha$  サブユニットの触媒ドメインと活性制御ドメインである  $\beta$  サブユニットとの間の相互作用形成が重要であり、この相互作用によって基質であるアスパラギン酸の結合が阻害され、代わりにリジンが競合的に結合することで活性制御が起こることを示すことができた。さらに、フィードバック阻害耐性変異株である Ser301Phe の結晶構造との比較から、この変異によってリジン・スレオニンの存在下でも閉じた構造が安定化されずに容易に活性

型へと変換してしまうために阻害耐性となっていることが示された。しかしながら、現時点では、不活性型や活性型、フィードバック阻害耐性変異体の間では構造の違いがあることは示されたが、その構造変化がどのように引き起こされているのかについては明らかになっていない。今後は、基質の結合した活性型の結晶構造を決定することや、結晶構造中の水素結合ネットワークの変化などをシミュレーションすることでより詳細な制御機構が明らかになると考えられる。

CgAK の制御機構が明らかになったことから、これらの知見がより効率的なリジン生産系の構築に応用できると考えられる。また、ヒトなどの高等動物はリジンを生合成できず AK を持たないことや、CgAK と結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 由来の AK との高いアミノ酸配列相同性をもつこと、さらにはリジン生合成経路の中間体である DAP が細胞壁の構成因子であることから、CgAK の結晶構造や活性制御機構に関する知見が抗結核剤をはじめとする抗生物質等の医薬品の開発の基盤となると考えられる。

また、これらの結晶構造や第四章で示した *T. thermophilus* の AK の活性制御ドメインの構造から ACT ドメインという広く様々な酵素に保存されたアロステリックなエフェクター結合に関わるドメインに関する新たな知見を示すことができた。ACT ドメインはその ACT ドメインでの相互作用様式や、エフェクター結合様式に多様性があることが知られている。本論文で示した $\alpha_2\beta_2$ 型 AK の活性制御ドメインのダイマー構成はホモオリゴマー型の AK の相互作用様式とも異なり、これまで示されている ACT ドメインの構造では見られていない新規なものであった。これらの知見は ACT ドメインを持つ他の酵素や転写制御因子などの制御機構を予測、解析する上で重要な情報となるであろう。

第四章ではスレオニンのみによって活性制御を受け、CgAK と同様の $\alpha_2\beta_2$  構造を持つ *T. thermophilus* 由来の AK (TtAK) の活性制御サブユニットの結晶構造を決定し、それにより、TtAK の活性制御機構や高い熱安定性についての考察を行った。TtAK の活性制御ドメインもダイマーであり、CgAK と同様にスレオニンの結合によってダイマー化することが明らかとなった。またスレオニンの結合していない活性制御ドメインの構造から、スレオニン結合サイトを覆うように存在する loop がスレオニンの結合による構造変化に重要であることが示された。今後 $\alpha_2\beta_2$  型の全長構造の決定などが、詳細な制御機構を明らかにするためには必要だと考えられる。

また、CgAK の活性制御ドメイン (CgAK $\beta$ ) と TtAK の活性制御ドメイン (TtAK $\beta$ ) の耐熱性を比較し、これらのよく似た結晶構造を基に TtAK $\beta$  の高い熱安定性の要因を明らかにした。

TtAK $\beta$ はCgAK $\beta$ に比べて約40℃高い変性温度を持ち、アミノ酸組成や天然状態と変性状態での表面積に占める疎水性残基の割合などの比較から、TtAK $\beta$ の高い熱安定性はその内部の疎水性相互差よみによる強いパッキングや、Pro残基によるloop構造の安定化によることが示された。TtAk $\beta$ の熱安定化機構が明らかとなったことから、この知見を生かしてCgAKのような工業的に重要な役割を持つ酵素の耐熱化が可能となり、効率的なリジン発酵系につながる可能性が考えられる。

第五章では、*C. glutamicum*とは異なる経路でリジンを生合成する*T. thermophilus*で発見された新規リジン生合成経路における新規キャリアタンパク質LysWと生合成酵素であるアミノ酸キナーゼLysZとの相互作用解析を行うことで、LysWのキャリアタンパク質としての働きを実証することに成功した。生合成中間体であるAAAの $\alpha$ -アミノ基の保護基として働くLysWであるが、これはAAAからリジンへの変換過程の第1番目の酵素であるLysXの反応によって生成することが示されている。LysW- $\gamma$ -AAAの結晶構造を決定することで、生化学的に示されていたLysX反応を構造生物学的にも明らかにすることができた。さらに、LysZ/LysW- $\gamma$ -AAA複合体の結晶構造を決定し、表面電荷計算やITC解析によってこれら2つのタンパク質間の相互作用が静電的な相互作用であることを示し、LysWが各酵素と静電的に相互作用することで効率的にリジン生産を行うためのキャリアタンパク質としての機能を持つことを実証できた。また、LysZ上にはLysW- $\gamma$ -AAAとの相互作用部位として2か所が考えられ、変異体解析から2か所のうち一方がLysZの機能発現に重要であることが示された。

これに加えて、LysW- $\gamma$ -AAAを介した他の生合成酵素との相互作用解析によって、各反応段階で、様々な複合体を形成することが示された。AAA以降の反応に関わる全ての酵素がLysWを介した巨大複合体を形成する可能性も含め、様々な方法でLysWのキャリアタンパク質としての性質を明らかにしていく必要がある。

この*T. thermophilus*で見出された新規リジン生合成経路の遺伝子クラスターは、ゲノム情報から古細菌を中心に保存されていることが示されている。さらに、*Sulfolobus*属ではLysXホモログ遺伝子をアルギニン生合成経路上にもう1つ持ち、LysZ、Y、J、Kの遺伝子を、アルギニン生合成経路中でのホモログであるArgB、C、D、Eを含めて1組しか持たない。つまり、LysX反応はAAAとグルタミン酸を初発とする2つの生合成経路でそれぞれ別の酵素が行うが、それ以降の反応はbifunctionalに働くことが示されつつある(平成22年度大内拓也修士論文)。つまり、*Sulfolobus*属のLysZはLysW- $\gamma$ -AAAとLysW- $\gamma$ -Gluを基質とすることができ、この1炭素鎖の違いがある両基質の認識機構にも興味を持たれるのに加えて、リ

ジン・アルギニン生合成の分化という観点で進化的にも興味深い。

本論文ではAKとLysZという、どちらも「リジン」を生合成する異なる経路で、同様の反応を行うアミノ酸キナーゼの構造、機能解析を行った。2つの酵素はどちらもAAK familyの典型的なfoldを取り、ATPによるinduced fitが起こるが、AKではACTドメインという制御ドメインを持つこと、またLysZとAKではそのリン酸化される側の基質の認識に関わるとされる部分に構造の違いが見られたことなど、共通点、相違点がある。現在、ゲノム配列解析に比べてタンパク質の立体構造解析は大きく後れを取っており、アミノ酸配列という限られた情報だけでは、その機能を誤ってアノテーションしてしまうことも少なくない。今後、タンパク質の立体構造解析をはじめとしてそれぞれの酵素の詳細な解析により、データベースを充実させていくことが必要であり、それによって個々の生物、または生物全体を理解することにつながるだろう。本博士論文研究がそのための一助となれば幸いである。

## 参考文献

1. Scapin G, Blanchard J: **Enzymology of bacterial lysine biosynthesis**. *Advances in Enzymology*, Vol 72 1998:279-324.
2. Chatterjee S, Singh B, Gilvarg C: **Biosynthesis of lysine in plants: the putative role of meso-diaminopimelate dehydrogenase**. *Plant Mol Biol* 1994, **26**(1):285-290.
3. Vogel H: **Distribution of lysine pathways among fungi - Evolutionary implications**. *American Naturalist* 1964:435-446.
4. Bhattacharjee J: **alpha-Aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes**. *Crit Rev Microbiol* 1985, **12**(2):131-151.
5. Broquist HP: **Lysine biosynthesis (yeast)**. *Methods Enzymol* 1971, **17**:112-129.
6. Kobashi N, Nishiyama M, Tanokura M: **Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, Thermus thermophilus: lysine is synthesized via alpha-aminoadipic acid not via diaminopimelic acid**. *J Bacteriol* 1999, **181**(6):1713-1718.
7. Kosuge T, Hoshino T: **Lysine is synthesized through the alpha-aminoadipate pathway in Thermus thermophilus**. *FEMS Microbiol Lett* 1998, **169**(2):361-367.
8. Nishida H, Nishiyama M, Kobashi N, Kosuge T, Hoshino T, Yamane H: **A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis**. *Genome Res* 1999, **9**(12):1175-1183.
9. Velasco A, Leguina J, Lazcano A: **Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways**. *J Mol Evol* 2002, **55**(4):445-459.
10. Xu Y, Labedan B, Glansdorff N: **Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007:36-47.
11. Umbarger H: **Amino acid biosynthesis and its regulation**. *Annu Rev Biochem* 1978, **47**:532-606.
12. Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H: **Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum**. *J Gen Microbiol* 1988, **134**(12):3221-3229.
13. Bulfer S, Scott E, Pillus L, Trievel R: **Structural basis for L-lysine feedback inhibition of homocitrate synthase**. *J Biol Chem* 2010, **285**(14):10446-10453.
14. Okada T, Tomita T, Wulandari A, Kuzuyama T, Nishiyama M: **Mechanism of substrate recognition and insight into feedback inhibition of homocitrate synthase from Thermus thermophilus**. *J Biol*



- Chem* 2010, **285**(6):4195-4205.
15. Born T, Blanchard J: **Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis.** *Curr Opin Chem Biol* 1999, **3**(5):607-613.
  16. Hudson A, Singh B, Leustek T, Gilvarg C: **An LL-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants.** *Plant Physiol* 2006, **140**(1):292-301.
  17. Paiva A, Vanderwall D, Blanchard J, Kozarich J, Williamson J, Kelly T: **Inhibitors of dihydrodipicolinate reductase, a key enzyme of the diaminopimelate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1545**(1-2):67-77.
  18. Miyazaki T, Miyazaki J, Yamane H, Nishiyama M: **alpha-Amino adipate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 7):2327-2334.
  19. Miyazaki J, Kobashi N, Nishiyama M, Yamane H: **Characterization of homoisocitrate dehydrogenase involved in lysine biosynthesis of an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27, and evolutionary implication of beta-decarboxylating dehydrogenase.** *J Biol Chem* 2003, **278**(3):1864-1871.
  20. Miyazaki J, Kobashi N, Nishiyama M, Yamane H: **Functional and evolutionary relationship between arginine biosynthesis and prokaryotic lysine biosynthesis through alpha-amino adipate.** *J Bacteriol* 2001, **183**(17):5067-5073.
  21. Miyazaki J, Kobashi N, Fujii T, Nishiyama M, Yamane H: **Characterization of a lysK gene as an argE homolog in *Thermus thermophilus* HB27.** *FEBS Lett* 2002, **512**(1-3):269-274.
  22. Wulandari A, Miyazaki J, Kobashi N, Nishiyama M, Hoshino T, Yamane H: **Characterization of bacterial homocitrate synthase involved in lysine biosynthesis.** *FEBS Lett* 2002, **522**(1-3):35-40.
  23. Horie A, Tomita T, Saiki A, Kono H, Taka H, Mineki R, Fujimura T, Nishiyama C, Kuzuyama T, Nishiyama M: **Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*.** *Nat Chem Biol* 2009, **5**(9):673-679.
  24. Woese C, Kandler O, Wheelis M: **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(12):4576-4579.
  25. Kinoshita S: **Amino-acid production by the fermentation process.** *Nature* 1972, **240**(5378):211.
  26. Shiio I, Miyajima R: **Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*.** *J Biochem* 1969, **65**(6):849-859.

27. Miyajima R, Otsuka S, Shio I: **Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition by amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis.** *J Biochem* 1968, **63**(2):139-148.
28. Rice E, Bannon G, Glenn K, Jeong S, Sturman E, Rydel T: **Characterization and crystal structure of lysine insensitive *Corynebacterium glutamicum* dihydrodipicolinate synthase (cDHDPS) protein.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **480**(2):111-121.
29. Sano K, Shio I: **Microbial production of L-lysine .3. Production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine.** *J Gen Appl Microbiol* 1970:373-391.
30. Shio I, Miyajima R, Sano K: **Genetically desensitized aspartate kinase to the concerted feedback inhibition in *Brevibacterium flavum*.** *J Biochem* 1970, **68**(5):701-710.
31. Cremer J, Eggeling L, Sahm H: **Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes.** *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**(6):1746-1752.
32. Jetten M, Sinskey A: **Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria.** *Crit Rev Biotechnol* 1995, **15**(1):73-103.
33. Ikeda M, Nakagawa S: **The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**(2-3):99-109.
34. Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns B, Gaigalat L *et al*: **The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins.** *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):5-25.
35. Ohnishi J, Mitsunashi S, Hayashi M, Ando S, Yokoi H, Ochiai K, Ikeda M: **A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **58**(2):217-223.
36. Ikeda M, Ohnishi J, Hayashi M, Mitsunashi S: **A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006, **33**(7):610-615.
37. Hayashi M, Ohnishi J, Mitsunashi S, Yonetani Y, Hashimoto S, Ikeda M: **Transcriptome analysis reveals global expression changes in an industrial L-lysine producer of *Corynebacterium glutamicum*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2006, **70**(2):546-550.

38. Kotaka M, Ren J, Lockyer M, Hawkins A, Stammers D: **Structures of R- and T-state Escherichia coli aspartokinase III. Mechanisms of the allosteric transition and inhibition by lysine.** *J Biol Chem* 2006, **281**(42):31544-31552.
39. Ramón-Maiques S, Marina A, Gil-Ortiz F, Fita I, Rubio V: **Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis.** *Structure* 2002, **10**(3):329-342.
40. Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Pérez-Arellano I, Cervera J, Fita I, Rubio V: **A novel two-domain architecture within the amino acid kinase enzyme family revealed by the crystal structure of Escherichia coli glutamate 5-kinase.** *J Mol Biol* 2007, **367**(5):1431-1446.
41. Ramón-Maiques S, Marina A, Guinot A, Gil-Ortiz F, Uriarte M, Fita I, Rubio V: **Substrate binding and catalysis in carbamate kinase ascertained by crystallographic and site-directed mutagenesis studies: movements and significance of a unique globular subdomain of this key enzyme for fermentative ATP production in bacteria.** *J Mol Biol* 2010, **397**(5):1261-1275.
42. Ramón-Maiques S, Marina A, Uriarte M, Fita I, Rubio V: **The 1.5 Å resolution crystal structure of the carbamate kinase-like carbamoyl phosphate synthetase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus, bound to ADP, confirms that this thermostable enzyme is a carbamate kinase, and provides insight into substrate binding and stability in carbamate kinases.** *J Mol Biol* 2000, **299**(2):463-476.
43. Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Rubio V: **The crystal structure of Pyrococcus furiosus UMP kinase provides insight into catalysis and regulation in microbial pyrimidine nucleotide biosynthesis.** *J Mol Biol* 2005, **352**(2):438-454.
44. Min L, Jin Z, Caldovic L, Morizono H, Allewell N, Tuchman M, Shi D: **Mechanism of allosteric inhibition of N-acetyl-L-glutamate synthase by L-arginine.** *J Biol Chem* 2009, **284**(8):4873-4880.
45. Cohen GN: **Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation**, edited by KM Herrmann & RL Somerville. In.: Reading, MA, USA: Addison-Wesley; 1983.
46. Nishiyama M, Kukimoto M, Beppu T, Horinouchi S: **An operon encoding aspartokinase and purine phosphoribosyltransferase in Thermus flavus.** *Microbiology* 1995, **141**:1211-1219.
47. Rognes S, Lea P, Mifflin B: **S-adenosylmethionine--a novel regulator of aspartate kinase.** *Nature* 1980, **287**(5780):357-359.
48. Kobashi N, Nishiyama M, Yamane H: **Characterization of aspartate kinase III of Bacillus subtilis.**

- Biosci Biotechnol Biochem* 2001, **65**(6):1391-1394.
49. Kalinowski J, Bachmann B, Thierbach G, Pühler A: **Aspartokinase genes lysC alpha and lysC beta overlap and are adjacent to the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene asd in Corynebacterium glutamicum.** *Mol Gen Genet* 1990, **224**(3):317-324.
  50. Kalinowski J, Cremer J, Bachmann B, Eggeling L, Sahm H, Pühler A: **Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from Corynebacterium glutamicum.** *Mol Microbiol* 1991, **5**(5):1197-1204.
  51. Chen N, Hu F, Paulus H: **Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of Bacillus subtilis aspartokinase II and their control regions.** *J Biol Chem* 1987, **262**(18):8787-8798.
  52. Kato C, Kurihara T, Kobashi N, Yamane H, Nishiyama M: **Conversion of feedback regulation in aspartate kinase by domain exchange.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **316**(3):802-808.
  53. Aravind L, Koonin E: **Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches.** *J Mol Biol* 1999, **287**(5):1023-1040.
  54. Chipman D, Shaanan B: **The ACT domain family.** *Curr Opin Struct Biol* 2001, **11**(6):694-700.
  55. Schuller D, Grant G, Banaszak L: **The allosteric ligand site in the Vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase.** *Nat Struct Biol* 1995, **2**(1):69-76.
  56. Grant G: **The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element.** *J Biol Chem* 2006, **281**(45):33825-33829.
  57. Robin A, Cobessi D, Curien G, Robert-Genthon M, Ferrer J, Dumas R: **A new mode of dimerization of allosteric enzymes with ACT domains revealed by the crystal structure of the aspartate kinase from Cyanobacteria.** *J Mol Biol* 2010, **399**(2):283-293.
  58. Ramón-Maiques S, Fernández-Murga M, Gil-Ortiz F, Vagin A, Fita I, Rubio V: **Structural bases of feed-back control of arginine biosynthesis, revealed by the structures of two hexameric N-acetylglutamate kinases, from Thermotoga maritima and Pseudomonas aeruginosa.** *J Mol Biol* 2006, **356**(3):695-713.
  59. Liu X, Pavlovsky A, Viola R: **The structural basis for allosteric inhibition of a threonine-sensitive aspartokinase.** *J Biol Chem* 2008, **283**(23):16216-16225.
  60. Meyer P, Evrin C, Briozzo P, Joly N, Bârzu O, Gilles A: **Structural and functional characterization of Escherichia coli UMP kinase in complex with its allosteric regulator GTP.** *J Biol Chem* 2008, **283**(51):36011-36018.

61. Llácer J, Contreras A, Forchhammer K, Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Maldonado R, Fita I, Rubio V: **The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(45):17644-17649.
62. Gil-Ortiz F, Ramón-Maiques S, Fita I, Rubio V: **The course of phosphorus in the reaction of N-acetyl-L-glutamate kinase, determined from the structures of crystalline complexes, including a complex with an AlF(4)(-) transition state mimic.** *J Mol Biol* 2003, **331**(1):231-244.
63. Cirillo J, Weisbrod T, Pascopella L, Bloom B, Jacobs WJ: **Isolation and characterization of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase operon from mycobacteria.** *Mol Microbiol* 1994, **11**(4):629-639.
64. Leonard P, Smits S, Sedelnikova S, Brinkman A, de Vos W, van der Oost J, Rice D, Rafferty J: **Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon Pyrococcus furiosus.** *EMBO J* 2001, **20**(5):990-997.
65. Schreiter E, Sintchak M, Guo Y, Chivers P, Sauer R, Drennan C: **Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR.** *Nat Struct Biol* 2003, **10**(10):794-799.
66. Devedjiev Y, Surendranath Y, Derewenda U, Gabrys A, Cooper D, Zhang R, Lezondra L, Joachimiak A, Derewenda Z: **The structure and ligand binding properties of the B. subtilis YkoF gene product, a member of a novel family of thiamin/HMP-binding proteins.** *J Mol Biol* 2004, **343**(2):395-406.
67. Mas-Droux C, Curien G, Robert-Genthon M, Laurencin M, Ferrer J, Dumas R: **A novel organization of ACT domains in allosteric enzymes revealed by the crystal structure of Arabidopsis aspartate kinase.** *Plant Cell* 2006, **18**(7):1681-1692.
68. Sambrook J, Russell DW: **Molecular cloning: a laboratory manual:** Cold Spring Harbor Laboratory Pr; 2001.
69. Bradford M: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
70. Otwinowski Z, Minor W: **Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.** *Methods Enzymol* 1997, **276**(Macromolecular Crystallography, Part A):307-326.
71. Collaborative Computational Project N: **The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994, **50**(5):760-763.
72. Vagin A, Teplyakov A: **MOLREP: an automated program for molecular replacement.** *J Appl Crystallogr* 1997, **30**:1022-1025.

73. McRee D: **XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density.** *J Struct Biol*, **125**(2-3):156-165.
74. Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS *et al*: **Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998, **54**:905-921.
75. Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM: **PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures.** *J Appl Crystallogr* 1993, **26**:283-291.
76. Merritt EA, Bacon DJ: **Raster3D: photorealistic molecular graphics.** *Methods Enzymol* 1997, **277**:505-524.
77. **The PyMOL Molecular Graphic System on World Wide Web <http://www.pymol.org>**
78. Schuck P: **Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling.** *Biophys J* 2000, **78**(3):1606-1619.
79. Black S, Wright N: **beta-Aspartokinase and beta-aspartyl phosphate.** *J Biol Chem* 1955, **213**(1):27-38.
80. Thierbach G, Kalinowski J, Bachmann B, Pühler A: **Cloning of a DNA fragment from Corynebacterium glutamicum conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartokinase.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1990, **32**(4):443-448.
81. Follettie M, Peoples O, Agoropoulou C, Sinskey A: **Gene structure and expression of the Corynebacterium flavum N13 ask-asd operon.** *J Bacteriol* 1993, **175**(13):4096-4103.
82. Gallagher D, Gilliland G, Xiao G, Zondlo J, Fisher K, Chinchilla D, Eisenstein E: **Structure and control of pyridoxal phosphate dependent allosteric threonine deaminase.** *Structure* 1998, **6**(4):465-475.
83. Wessel P, Graciet E, Douce R, Dumas R: **Evidence for two distinct effector-binding sites in threonine deaminase by site-directed mutagenesis, kinetic, and binding experiments.** *Biochemistry* 2000, **39**(49):15136-15143.
84. Paris S, Viemon C, Curien G, Dumas R: **Mechanism of control of Arabidopsis thaliana aspartate kinase-homoserine dehydrogenase by threonine.** *J Biol Chem* 2003, **278**(7):5361-5366.
85. Marina P, Martínez-Costa O, Calderón I, Aragón J: **Characterization of the aspartate kinase from Saccharomyces cerevisiae and of its interaction with threonine.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **321**(3):584-591.

86. Emsley P, Cowtan K: **Coot: model-building tools for molecular graphics.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004, **60**(Pt 12 Pt 1):2126-2132.
87. Murshudov G, Vagin A, Dodson E: **Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997, **53**(Pt 3):240-255.
88. Painter J, Merritt E: **Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2006, **62**(Pt 4):439-450.
89. Davis I, Leaver-Fay A, Chen V, Block J, Kapral G, Wang X, Murray L, Arendall Wr, Snoeyink J, Richardson J *et al*: **MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue):W375-383.
90. Terwilliger T, Berendzen J: **Automated MAD and MIR structure solution.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1999, **55**(Pt 4):849-861.
91. Terwilliger T: **Automated structure solution, density modification and model building.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, **58**(Pt 11):1937-1940.
92. Hayward S, Lee R: **Improvements in the analysis of domain motions in proteins from conformational change: DynDom version 1.50.** *J Mol Graph Model* 2002, **21**(3):181-183.
93. Laue, M. T: **Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins.** In: Edited by Shah, D. B. Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science (Harding, S. E., Rowe, A. J., and Horton, L. C., eds): Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK; 1992: 90-125.
94. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ: **Image Processing with ImageJ.** *Biophotonics International* 2004, **11**(7):36-42.
95. Kleywegt G, Jones T: **Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994, **50**(Pt 2):178-185.
96. McDonald I, Thornton J: **Satisfying hydrogen bonding potential in proteins.** *J Mol Biol* 1994, **238**(5):777-793.
97. Eisenhaber F, Argos P: **Improved strategy in analytic surface calculation for molecular-systems - Handling of singularities and computational-efficiency.** *J Comput Chem* 1993, **14**(11):1272-1280.
98. Eisenberg D, McLachlan A: **Solvation energy in protein folding and binding.** *Nature* 1986, **319**(6050):199-203.
99. Pettersen E, Goddard T, Huang C, Couch G, Greenblatt D, Meng E, Ferrin T: **UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.** *J Comput Chem* 2004,

- 25(13):1605-1612.
100. Faehnle C, Liu X, Pavlovsky A, Viola R: **The initial step in the archaeal aspartate biosynthetic pathway catalyzed by a monofunctional aspartokinase.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2006, **62**(Pt 10):962-966.
  101. Miyazaki J, Asada K, Fushinobu S, Kuzuyama T, Nishiyama M: **Crystal structure of tetrameric homoisocitrate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*: involvement of hydrophobic dimer-dimer interaction in extremely high thermotolerance.** *J Bacteriol* 2005, **187**(19):6779-6788.
  102. Kauzmann W: **Some factors in the interpretation of protein denaturation.** *Adv Protein Chem* 1959, **14**:1-63.
  103. Perutz M, Raidt H: **Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2.** *Nature* 1975, **255**(5505):256-259.
  104. Kellis JJ, Nyberg K, Sali D, Fersht A: **Contribution of hydrophobic interactions to protein stability.** *Nature* 1988, **333**(6175):784-786.
  105. Matthews B, Nicholson H, Becktel W: **Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(19):6663-6667.
  106. Petsko G: **Structural basis of thermostability in hyperthermophilic proteins, or "there's more than one way to skin a cat".** *Methods Enzymol* 2001, **334**:469-478.
  107. Querol E, Perez-Pons J, Mozo-Villarias A: **Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability.** *Protein Eng* 1996, **9**(3):265-271.
  108. Vogt G, Woell S, Argos P: **Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs.** *J Mol Biol* 1997, **269**(4):631-643.
  109. Majerus P, Alberts A, Vagelos P: **The acyl carrier protein of fatty acid synthesis: Purification, physical properties, and substrate binding site.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964, **51**:1231-1238.
  110. Stachelhaus T, Hüser A, Marahiel M: **Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases.** *Chem Biol* 1996, **3**(11):913-921.
  111. Lomakin I, Xiong Y, Steitz T: **The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together.** *Cell* 2007, **129**(2):319-332.
  112. Jenni S, Leibundgut M, Boehringer D, Frick C, Mikolásek B, Ban N: **Structure of fungal fatty acid**



- synthase and implications for iterative substrate shuttling.** *Science* 2007, **316**(5822):254-261.
113. Petrek M, Otyepka M, Banás P, Kosinová P, Koca J, Damborský J: **CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:316.
114. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV: **Structural classification of zinc fingers: survey and summary.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(2):532-550.
115. Gill DJ, Teo H, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD, Williams RL: **Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking.** *EMBO J* 2007, **26**(2):600-612.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導、ご助言、ご協力を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学部門の西山真教授には、私が学部四年次に卒論生として研究室に配属されてから6年間、実験、研究の指導だけでなく、研究という仕事に対する考え方や研究者としての姿勢など多くのことを学ばせていただきました。心より感謝申し上げます。同研究部門葛山智久准教授には、実験の進め方に対してのご助言を頂き、また研究者としての姿勢を教えてくださいました。深く感謝いたします。また、同研究部門富田武郎助教には、私が全く何もわからないころから、事細かに実験方法や計画の立て方などをご指導いただくとともに、研究に対する姿勢を伝えていただき、大変お世話になりました。ありがとうございました。

X線結晶構造解析にあたり、本学農学生命科学研究科応用生命工学専攻酵素学研究室の伏信進矢助教には、全くの初心者の私にご指導いただいたり、実験の進み具合を気にかけていただいたりと本当にお世話になりました。心より感謝申し上げます。また、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の構造生物学ビームラインのスタッフの皆様には、素晴らしい実験の場を与えていただき大変感謝しております。ありがとうございました。

超遠心実験におきまして測定及び解析方法をご指導いただきました、理化学研究所の新野(柊元)睦子博士には大変お世話になりました。感謝申し上げます。

熱量測定におきまして DSC を使用させていただき、また測定法をご指導くださいました元本学農学生命科学研究科水圏生物学専攻水圏生物工学研究室、現・同専攻水産化学研究室渡部終五教授ならびに福島英登博士に感謝申し上げます。また、ITC を使用させていただき、測定法をご指導くださいました本学生物生産工学研究センター環境保全工学部門、野尻秀昭准教授及び同博士課程二年梅田隆志氏に感謝申し上げます。

日本原子力研究開発機構関西光科学研究所生体分子シミュレーション研究グループの河野英俊グループリーダーにはタンパク質の安定性の解析やモデリングなどでお世話になり、またその研究姿勢に大変刺激を受けました。感謝申し上げます。

高分解能の分析手法による反応生成物の構造決定、ならびにオリゴペプチドの合成には、順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター生体分子研究部門の藤村務准教授、ならびに同研究科アトピー疾患研究センター分子生物学研究部門の西山千春准教授をはじめ

め、多くの方にご協力いただきました。ここに感謝申し上げます。

細胞機能工学研究室の先輩・同輩・後輩の皆様には、日々の研生活を支えていただきました。6年間の研究室生活の中で悩むことも少なからずありましたが、くだらない話からまじめな話まで皆さんとの会話で、辛いときなど本当に助けられました。この場を借りて心より感謝を申し上げるとともに、皆様の今後のご活躍をお祈りいたします。

最後になりましたが、色々な面で常に私を支えてくれた両親に感謝申し上げます。

ありがとうございました。