

Thermus thermophilus 由来 α -アミノアジピン酸アミノ基転移酵素(AAA-AT)の
基質認識機構の解析

**Analysis of the substrate recognition mechanism of an
 α -aminoadipate aminotransferase from *Thermus thermophilus***

大内拓也¹、富田武郎¹、宮川智治¹、葛山智久¹、西山真^{1,2}

Takuya Ouchi¹, Takeo Tomita¹, Tomoharu Miyagawa¹, Tomohisa Kuzuyama¹, Makoto Nishiyama^{1,2}

(¹東京大学、生物生産工学研究センター、²理研SPRING-8)

(¹Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, ²RIKEN SPRING-8)

e-mail: aa096092@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

一般に細菌は、アスパラギン酸を初発物質としてジアミノピメリン酸(DAP)を経由する DAP 経路で、カビや酵母は 2-オキソグルタル酸(2-OG)を初発物質として、 α -アミノアジピン酸(AAA)やサッカロピンを經由する AAA 経路でリジンを生合成すると考えられている。しかし、*Thermus thermophilus* は AAA を中間体としてリジンを生合成することが、我々の研究により明らかとなった [1] (Fig. 1)。AAA までの反応はロイシン生合成経路や TCA cycle の一部と相同性を示し、カビや酵母と同一であるが、AAA 以降の経路は、サッカロピンを經由するカビや酵母の AAA 経路とは異なり、アルギニン生合成経路と相同性を示す [2]。さらに、アルギニン生合成経路において Glu のアミノ基はアセチル基によって保護されるのに対して、*T. thermophilus* のリジン生合成経路において、AAA のアミノ基は 54 アミノ酸で構成されるタンパク質 LysW によって保護される [3]。

α -アミノアジピン酸アミノ基転移酵素(AAA-AT)は、pyridoxal 5'-phosphate (PLP)を補酵素として、*T. thermophilus* のリジン生合成経路において 2-オキソアジピン酸 (2-OA)を AAA へと変換する酵素である [4]。AAA-AT は本来の基質である AAA、Glu 以外にも Leu、Phe、Kynurenine などに対して活性を示す。この幅広い基質認識機構を明らかにするため、本研究室においてこれまでに PLP のみを含む構造、PLP と Leu を含む構造、反応中間体である external-aldimine 様の基質アナログ複合体であり、Leu と PLP が結合した *N*-(5'-phosphopyridoxyl)-L-leucine (PPL)を含む構造、同じく AAA と PLP が結合した *N*-(5'-phosphopyridoxyl)-L- α -aminoadipate (PPA)を含む構造が決定されている (Fig. 2)。これらの構造より、基質の非存在下では $\alpha 2$ ヘリックスは活性中心から離れた open form をとっていること、そして基質が入ることにより $\alpha 2$ ヘリックスは移動・回転し、活性中心を覆うことで closed form をとり、様々に異なる基質を認識していることが示された [5] (Fig. 3)。

今回、この $\alpha 2$ ヘリックスにおいて、ホモログ間で保存された残基Ser20 とArg23 の改変体の動力的解析を行ったところ、改変体では野生型酵素と比較してAAAに対する K_m は上昇したのに対し、Leuに対する K_m には変化がなかった。この結果より、結晶構造から予想された通り、これらの残基はAAAの側鎖カルボキシル基の認識を担うが、Leuの認識には関与しないことが明らかとなった。

また、まだ決定されていなかった Glu と PLP が結合した external-aldimine 様アナログである *N*-(5'-phosphopyridoxyl)-L-glutamate (PPE)を含むAAA-ATの結晶構造を (Fig. 2)、1.67 Å分解能で決定した。このPPE complexとPPA complexはr.m.s.d. = 0.25 Åで重ね合わせられ、全体構造も基質認識部位もほぼ同一の構造をとっていた (Fig. 4)。GluはAAAより一炭素短いが、PPEのGlu部分の γ -カルボキシル基は、PPAのAAA部分の δ -カルボキシル基と同様Arg23 側鎖に認識されていて、両カルボキシル基はほぼ同一の位置を占めていた。先の改変体においてGluに対する K_m を測定したところ、AAAのときと同様

野生型と比較して上昇した。このことは、Arg23、Ser20 はAAAだけでなくGluの認識にも重要な役割を担っていることを示している。さらに、Gluと同じ側鎖を持つ 2-オキソグルタル酸(2-OG)に対する K_m は、Gluに対する K_m が上昇したのとは対照的に、野生型とほとんど同じ値を示した。このことから、2-OGはGluと構造が類似しているにも関わらず、異なる残基に認識されることが推測された。

Ser20 はPPE、PPAと直接結合しているわけではないが、この残基の改変体ではGlu、AAAに対する K_m が上昇した。結晶構造より、Ser20 側鎖はGlu、AAAを認識するArg23 の主鎖のN原子と相互作用している様子が観察されたことから、Ser20 はArg23 の位置を固定することで間接的にGlu、AAAの認識に関わっていると考えられる。また、どの基質を用いた場合でも、改変体の k_{cat} は著しく低下した。PPE、PPA complexにおいては、Ser20、Arg23 は基質の認識に加えて周辺の残基と相互作用している。PPL complexにおいては、Arg23 は活性中心とは反対方向を向いて、Ser20 はPPE、PPA complexとは違う残基と相互作用することで、 $\alpha 2$ ヘリックスの疎水面を活性中心に向けている (Fig. 4)。このようにして、Ser20 とArg23 はclosed formを安定化する役割も担っているため、改変体では k_{cat} が著しく低下したと考えられる。

References

- [1] Kobashi N. et al. (1999) J Bacteriol. 181, 1713-1718
- [2] Miyazaki J. et al. (2001) J Bacteriol. 183, 5067-5073
- [3] Horie A. et al. (2009) Nat Chem Biol. [Epub ahead of print]
- [4] Miyazaki T. et al (2004) Microbiology. 150, 2327-2334
- [5] Tomita T. et al. (2009) Proteins. 75, 348-359

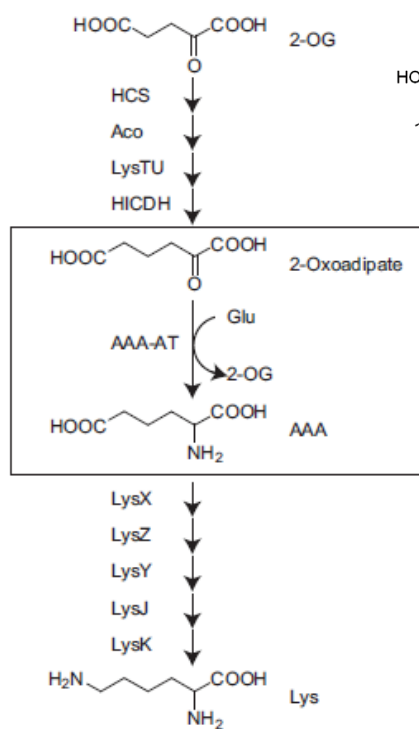


Fig. 1

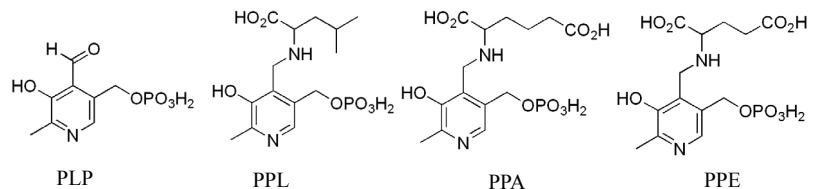


Fig. 2

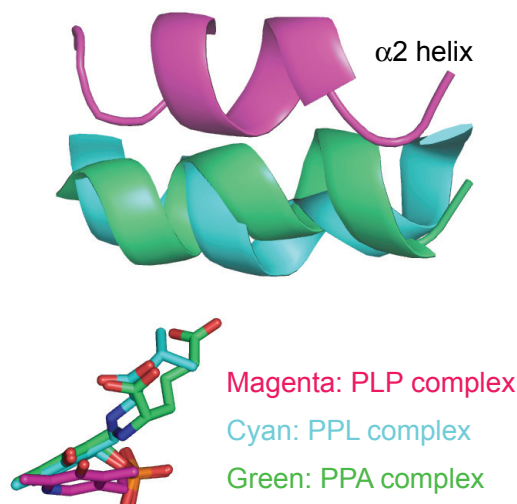


Fig. 3

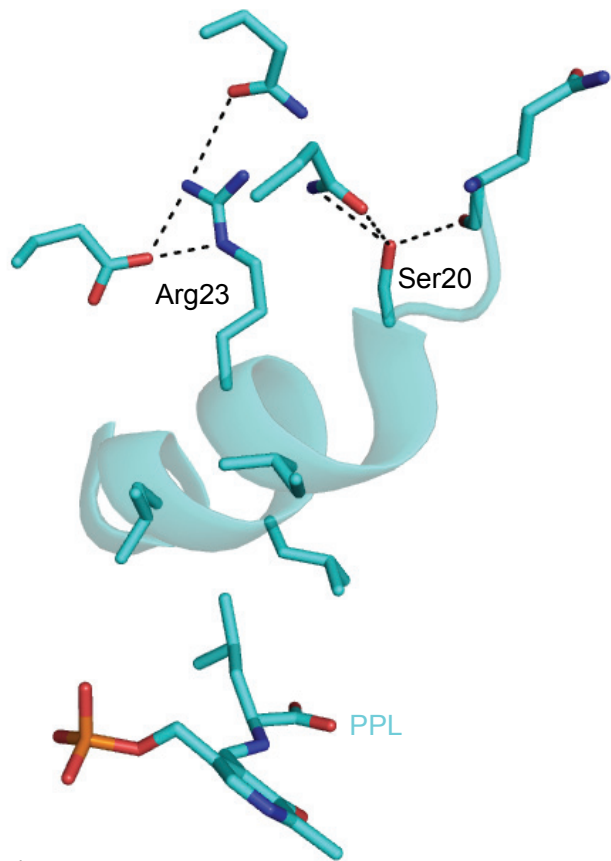
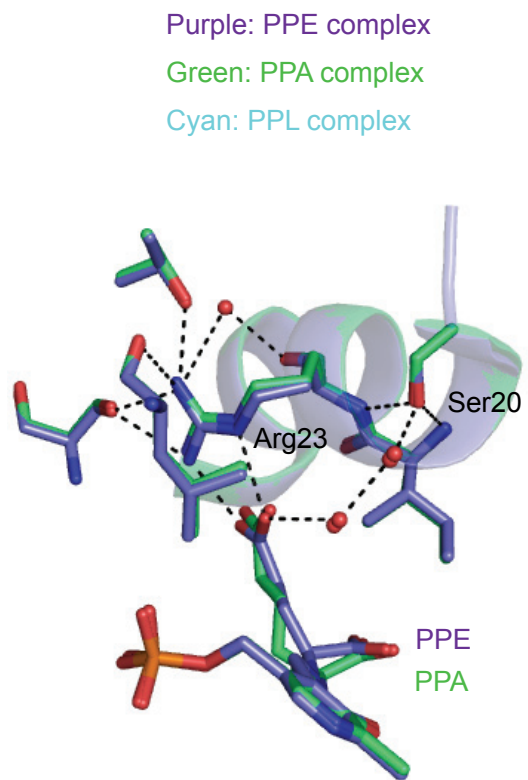


Fig. 4