

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株由来 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 -amino adipate aminotransferase,
AAA-AT, from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB27**

Tomoharu Miyagawa, Takashi Miyazaki, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama

宮川智治、宮崎高志、富田武郎、葛山智久、西山真

(Biotechnology Research Center, The University of Tokyo)

(東京大学、生物生産工学研究センター)

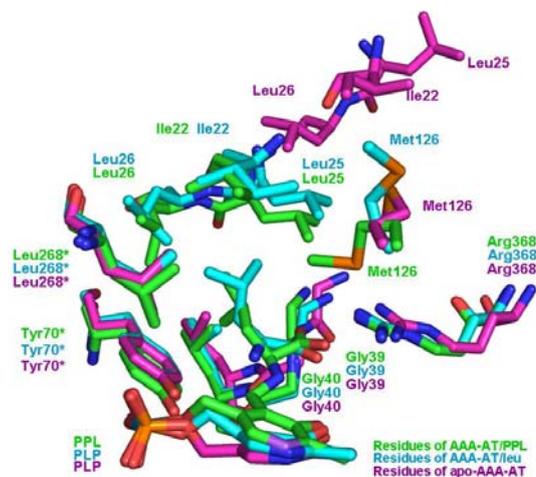
E-mail: umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

リジンは高等動物における必須アミノ酸の一つであるが、これを生合成することが可能な生物も多く存在し、一般に植物や真正細菌は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 α -アミノアジピン酸(AAA)を経由する AAA 経路でリジンを生合成する。しかし、*Thermus thermophilus* は真正細菌であるにもかかわらず DAP 経路ではなく AAA 経路を用い、さらに AAA 以降はサッカロピンを經由するカビ・酵母の経路と異なる生合成経路によってリジンを生合成していることが明らかとなった。本経路は代謝の流れや酵素の配列相同性、機能において AAA までは TCA サイクルやロイシン生合成経路に、AAA 以降はアルギニン生合成経路に類似していると考えられ、生合成経路の進化に関する研究の格好の材料と考えられる。

AAA-ATはヒト由来 kynurenine/AAA アミノ基転移酵素(KAT)II のホモログとしてクローン化された。遺伝子破壊株の解析や組換えタンパク質の酵素学的解析から、本生合成経路の第 5 番目の反応を担うこと、そして分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(BcAT)や芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素(AroAT)、そして KAT としての活性も持っていることが明らかとなった。

大腸菌に発現させ精製した AAA-AT の結晶化に成功し、最大分解能 2.26Å の回折データを得たので *Thermotoga maritima* 由来 putative aminotransferase (Tm1131)をモデルとした分子置換法によって構造を決定した。本酵素はアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)や AroAT、KATII を含む aminotransferase fold type I に属していることが明らかになり、また決定した構造の活性中心には補酵素である pyridoxal 5'-phosphate (PLP)及び基質であるロイシンが含まれていた。これは、KATII ホモログとして初めての基質酵素複合体の構造決定となった。また、この構造をモデルとして PLP のみが含まれた apo-AAA-AT の構造を最大分解能 2.67Å で決定した。さらに、ロイシンと PLP が共有結合した *N*-phosphopyridoxyl-leucine (PPL)を化学合成し、PPL と AAA-AT との複合体(AAA-AT/PPL)の結晶構造を最大分解能 1.75Å で決定した。

これらの構造の比較から、AAA-AT の活性中心近傍には自由度の高いヘリックス α 1 が存在し、その構造変化によって AAA-AT は幅広い基質特異性を獲得していることが示唆された。その改変を目指した変異体の作製についても併せて報告する予定である。



図：AAA-AT の活性中心構造比較