

2024年12月23日

報道関係者各位

北里大学

6種類の機能を持つD-アミノ酸代謝酵素を 初期の生命から発見

北里大学薬学部分析化学教室の宮本哲也講師、東京大学大学院農学生命科学研究科の伏信進矢教授らの研究グループは、共通の祖先に近い生物である超好熱菌 *Thermotoga maritima*^{*1} から異なる6種類の機能を持つ多機能型アミノ酸代謝酵素を発見しました。この多機能型酵素は、D-アミノ酸及びL-アミノ酸の両方を代謝できることを明らかにしました。さらに、酵素の立体構造及び反応メカニズムを明らかにしました。この研究成果は、2024年12月11日付で、米国化学会の学術誌「ACS Catalysis」に掲載されました。

研究成果のポイント

- ◆ 初期の生命である超好熱菌から多機能型アミノ酸代謝酵素 TM1270 を発見しました。
- ◆ 多機能型アミノ酸代謝酵素 TM1270 は、異なる6種類の機能を有する前例のない酵素であることを明らかにしました。
- ◆ 多機能型アミノ酸代謝酵素 TM1270 は、D-アミノ酸及びL-アミノ酸の両方を代謝できることを明らかにしました。
- ◆ 多機能型アミノ酸代謝酵素 TM1270 の立体構造を明らかにしました。
- ◆ 多機能型アミノ酸代謝酵素 TM1270 が持つ異なる6種類の機能の反応メカニズムを明らかにしました。

研究の背景

アミノ酸には、L型とその鏡像異性体であるD型が存在します。生命は基本的にL-アミノ酸のみを使って、タンパク質を作りますが、分析技術の発展に後押しされて、D-アミノ酸も様々な生物種に存在していることが確認されたことで、各生物にD-アミノ酸を積極的に利用するシステムが備わっていると考えられています。細菌において、D-アミノ酸は細胞壁のペプチドグリカン^{*2}や抗生物質の構成成分に利用されています。哺乳類ではD-アミノ酸を合成する酵素は一つしか知られていませんが、細菌は様々なD-アミノ酸合成酵素^{*3}を有しており、それらの酵素によって細胞壁の合成に必要なD-アミノ酸を作っています。細胞壁のD-アミノ酸を合成する酵素は薬剤のターゲットとなり、近年では、細菌のバイオフィルム^{*4}がD-アミノ酸の存在下で解体されることや腸内細菌が合成するD-アミノ酸が宿主の病態や健康に影響を与えることが明らかとなり、医学・薬学的観点からも注目されています。しかしながら、多種多様な細菌に存在する多様なD-アミノ酸代謝酵素に関する知見は、まだまだ不十分です。

研究内容と成果

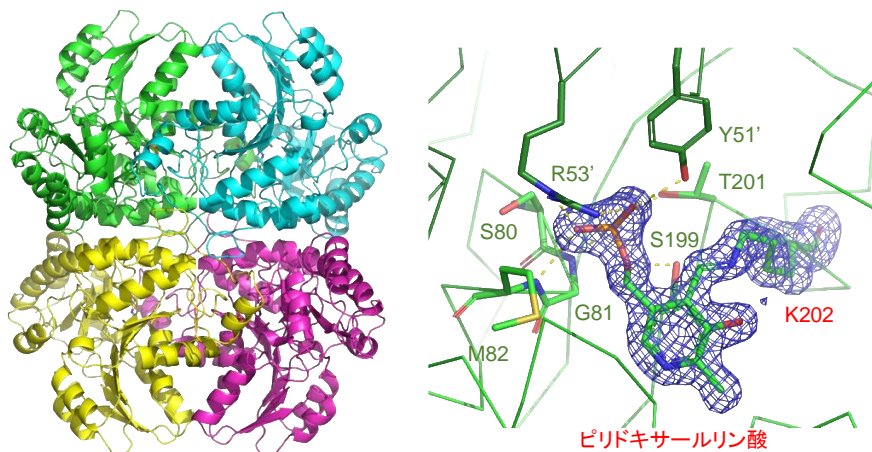
本研究では、共通の祖先に近い生物である、超好熱菌 *Thermotoga maritima* を対象にD-アミノ酸代謝酵素を探索しました。我々の研究グループでは、以前大腸菌から多機能型アミノ酸代謝酵素（シスタチオニン β-リアーゼ^{*5}）を発見しており（参考文献1）、その知見に基づいて *Thermotoga maritima* の TM1270 という酵素に注目しました。TM1270 は、ラセマーゼ活性、β-C-S リアーゼ活性、デヒドラターゼ活性、アルドラーゼ活性、デカルボキシラーゼ活性、アミノトラ

ンスフェラーゼ活性の異なる 6 種類の活性をいずれも効率良く触媒することを明らかにしました【表 1】。ラセマーゼ活性とは、L-アミノ酸と D-アミノ酸を相互に変換する活性、すなわち、L-アミノ酸から D-アミノ酸を合成する活性です。TM1270 は、14 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示し、その中でグルタミン酸に対して最も活性が高いことが明らかになりました。また、我々の研究グループは、過去の研究で TM1270 が細胞壁の構成成分の一つである D-グルタミン酸の合成に寄与していることを明らかにしています（参考文献 2）。βC-S リアーゼ活性とは、システインなどに含まれる炭素-硫黄結合を切断する活性で、システインはピルビン酸、硫化水素、アンモニアへと分解されます。TM1270 は、L 型と D 型両方のシステインと L-シスタチオンを分解する活性を有することを明らかにしました。デヒドラターゼ活性とは、セリンなどヒドロキシ基 (-OH) を含むアミノ酸を分解する活性で、セリンはピルビン酸とアンモニアに分解されます。TM1270 は、L 型と D 型の両方のセリン及び L-*allo*-スレオニン^{※6} に対してデヒドラターゼ活性を示すことが明らかとなりました。アルドラーゼ活性とは、炭素-炭素結合を切断する活性で、例えば、スレオニンをグリシンとアセトアルデヒドに分解する活性です。TM1270 は、L-スレオニンと L-*allo*-スレオニンに対してアルドラーゼ活性を示すことがわかりました。デカルボキシラーゼ活性とは、カルボキシ基 (-COOH) を持つアミノ酸に対して作用し、二酸化炭素を脱離させる活性です。TM1270 は、L-アスパラギン酸を L-アラニンと二酸化炭素に分解する活性を有することを明らかにしました。アミノトランスフェラーゼ活性は、アミノ酸のアミノ基 (-NH₂) を 2-オキソ酸へと転移させ、別のアミノ酸を合成する活性です。TM1270 は、16 種類のアミノ酸及び 7 種類の 2-オキソ酸に対してアミノトランスフェラーゼ活性を示すことが明らかになりました。以上の解析結果から、TM1270 は非常に多くの D-アミノ酸及び L-アミノ酸を代謝することができる前例のないアミノ酸代謝酵素であることが明らかとなりました。

6 種類の活性	TM1270 が触媒する代表的な反応
ラセマーゼ	L-グルタミン酸 ⇌ D-グルタミン酸
βC-S リアーゼ	L-システイン → ピルビン酸 + 硫化水素 + アンモニア
デヒドラターゼ	L-セリン または D-セリン → ピルビン酸 + アンモニア
アルドラーゼ	L-スレオニン → グリシン + アセトアルデヒド
デカルボキシラーゼ	L-アスパラギン酸 ⇌ L-アラニン + 二酸化炭素
アミノトランスフェラーゼ	L-アラニン + グリオキシル酸 ⇌ グリシン + ピルビン酸

【表 1】 TM1270 が有する 6 種類の機能

また、TM1270 の立体構造を X 線結晶構造解析^{※7} により明らかにしました【図 1】。TM1270 は 4 量体であり、分子内に補酵素となるピリドキサルリン酸^{※8} が結合していました。このピリドキサルリン酸は、TM1270 が有する 6 種類の多様な反応を触媒するのに欠かせない化合物です。TM1270 の立体構造と他の生物が持つ TM1270 と類似した酵素の立体構造を比較することで、TM1270 において多機能性に関わる重要なアミノ酸残基を推定しました。また、それらのアミノ酸残基を別の種類のアミノ酸に置換した変異酵素を作製し、各種の酵素活性への影響を解析することにより、多機能性に関わるアミノ酸残基を特定しました。さらに、TM1270 の立体構造及び変異酵素の機能解析の結果を総合することで、6 種類の酵素活性における原子レベルでの反応機構を推定することに成功しました。



【図 1】 TM1270 の立体構造 (4 量体; 左) 及び活性中心部位 (右)

202 番目のリジン (K202) と結合したピリドキサルリン酸の電子密度マップを青色のカゴで示している。

今後の展開

現在でも各種生物における D-アミノ酸の代謝経路の多くがブラックボックスのままです。例えば、哺乳類において D-アスパラギン酸は、内分泌系においてホルモン分泌や合成に関わる重要な分子ですが、その生合成経路は不明なままです。本研究の対象となった *Thermotoga maritima* においても、細胞壁に欠かせない構成成分である D-アラニンの生合成経路は明らかになっていません。本研究結果に基づく、多機能型アミノ酸代謝酵素が未知の D-アミノ酸代謝を紐解く鍵であると考えられます。したがって、新たな多機能型アミノ酸代謝酵素の発見が未知の D-アミノ酸代謝経路の発見に繋がっていくものと考えています。さらに、本研究の成果を含め、新たな D-アミノ酸代謝酵素の発見は、病原菌の感染予防及び治療、抗菌剤ターゲットの拡張などの医学・薬学的側面にも貢献します。

論文情報

掲載誌：ACS Catalysis

論文名：Functional and structural analyses of a highly multifunctional enzyme TM1270 from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*

著者：宮本哲也*、新田峻平、本間 浩、伏信進矢* (*責任著者)

DOI：10.1021/acscatal.4c05275

■本研究は JSPS 科研費 (JP21K05348、JP24K08668、JP19H00929)、公益財団法人倶進会の助成を受けたものです。

用語解説

※1 *Thermotoga maritima*

海底の熱水地帯にある堆積物から単離された細菌である。80°Cで最も良く生育し、最高 90°Cの環境で生育することができる嫌気性の超好熱性細菌である。標準的な系統解析に基づく、共通の祖先に近い生命の一つである。

※2 ペプチドグリカン

細菌の細胞壁に存在するペプチドグリカンは、N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸が交互に繋がっており、ペプチド鎖によって架橋されている。このペプチドには通常、D-アラニンと D-グルタミン酸の 2 種類の D-アミノ酸が含まれている。*Thermotoga maritima* のペプチドグリカンにおいては、これら 2 種類の D-アミノ酸に加えて、D-リジンが含まれている。

※3 D-アミノ酸合成酵素

L-アミノ酸からD-アミノ酸を合成するアミノ酸ラセマーゼと、ある種類のアミノ酸を別の種類のアミノ酸に変換するD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが含まれる。上記ペプチドグリカンに含まれている2種類のD-アミノ酸は、アラニンラセマーゼとグルタミン酸ラセマーゼによってそれぞれ合成される。*Thermotoga maritima*において、D-リジンはリジンラセマーゼ、D-グルタミン酸は TM1270 及び D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼによって合成されることを、我々の研究グループが明らかにした(参考文献2、3)。

※4 バイオフィルム

微生物や微生物が生産する物質(多糖類、タンパク質、DNA など)が集まってできた構造体の総称である。D-アミノ酸は、細菌のバイオフィルムの形成を阻害したり、解体を促進したりすることが明らかとなっている。

※5 シスタチオニン β-リアーゼ

細菌において、アミノ酸の一種であるL-メチオニンの合成に関わる酵素である。我々の研究グループでは、この酵素がβC-S リアーゼ活性に加えて、アミノ酸ラセマーゼ活性及びセリンデヒドラターゼ活性を有することを明らかにした(参考文献1)。

※6 L-*allo*-スレオニン

スレオニンは、2つの光学活性中心を有していることから、4つの異性体が存在している。すなわち、L-スレオニン、D-スレオニン、L-*allo*-スレオニン、D-*allo*-スレオニンである。

※7 X線結晶構造解析

タンパク質の結晶を作り、その結晶にX線を照射して得られる回折データを解析することで、タンパク質の立体構造を明らかにする方法である。

※8 ピリドキサルリン酸

ビタミンB₆の活性型であり、酵素内のリジン残基と結合して補酵素として作用する。ピリドキサルリン酸を補酵素とする酵素においては、活性の発現に欠かせない化合物である。

参考文献

1. 掲載誌: Biochemical Journal
論文名: Cystathionine β-lyase is involved in D-amino acid metabolism
DOI: 10.1042/BCJ20180039
2. 掲載誌: The FEBS Journal
論文名: Identification of a novel D-amino acid aminotransferase involved in D-glutamate biosynthetic pathways in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*
DOI: 10.1111/febs.16452
3. 掲載誌: The FEBS Journal
論文名: Elucidation of the D-lysine biosynthetic pathway in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*
DOI: 10.1111/febs.14720

問い合わせ先

《研究に関すること》

北里大学薬学部分析化学教室
講師 宮本哲也
e-mail: miyamotot@pharm.kitasato-u.ac.jp

《取材に関すること》

学校法人北里研究所 広報室
〒108-8641 東京都港区白金5-9-1
TEL: 03-5791-6422
e-mail: kohoh@kitasato-u.ac.jp