

# 枯草菌のメチオニン還元硫黄再生経路で働く酵素群の解析

齋藤 洋太郎

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座

(横田 明穂 教授)

2008年



## 目次

|                                       | 頁  |
|---------------------------------------|----|
| 第1章 緒論                                | 4  |
| 第2章 メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼの解析          | 8  |
| 2-1 序論                                |    |
| 2-2 材料と方法                             |    |
| 2-3 結果                                |    |
| 2-4 考察                                |    |
| 第3章 メチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼの解析        | 25 |
| 3-1 序論                                |    |
| 3-2 材料と方法                             |    |
| 3-3 結果                                |    |
| 3-4 考察                                |    |
| 第4章 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼの解析 | 41 |
| 4-1 序論                                |    |
| 4-2 材料と方法                             |    |
| 4-3 結果                                |    |
| 4-4 考察                                |    |
| 第5章 結論                                | 59 |
| 謝辞                                    | 66 |
| 参考文献                                  | 67 |
| 論文目録                                  | 83 |

## 第 1 章

### 緒論

硫黄は生物にとって不可欠な役割を果たしている。含硫アミノ酸のメチオニンやシステインはタンパク質の構成成分であり、それぞれタンパク質の翻訳開始やチオール基を介したジスルフィド結合による高次構造形成などに欠かすことができない。エネルギー代謝の面でも、その酸化還元電位を利用して電子伝達やエネルギーの生産に利用されている。電子伝達系における鉄-硫黄クラスターや、一部の光合成/化学合成細菌で電子供与体として使われている硫化水素などの硫黄化合物が、電子の授受を介したエネルギー生産に重要であることが知られている。一方で、土壌中などの自然界では、無機硫黄の多くは酸化型で存在し、また、生物は毒性のある還元型の硫化水素を直接取り込めないために、酸化型の硫酸イオンの形で吸収し、体内で多くのエネルギーを投じて還元する必要がある。そのため、体内の還元型の硫黄化合物をメチオニンへ再生するメチオニン還元硫黄再生経路は、硫黄資源のみならず、エネルギーの有効利用に非常に役立っている。

メチオニン還元硫黄再生経路は、ポリアミン合成における副産物であるメチルチオアデノシン (MTA) に含まれる還元硫黄をメチオニンに再生する経路である (Fig. 1-1) (Sekowska et al., 2004)。

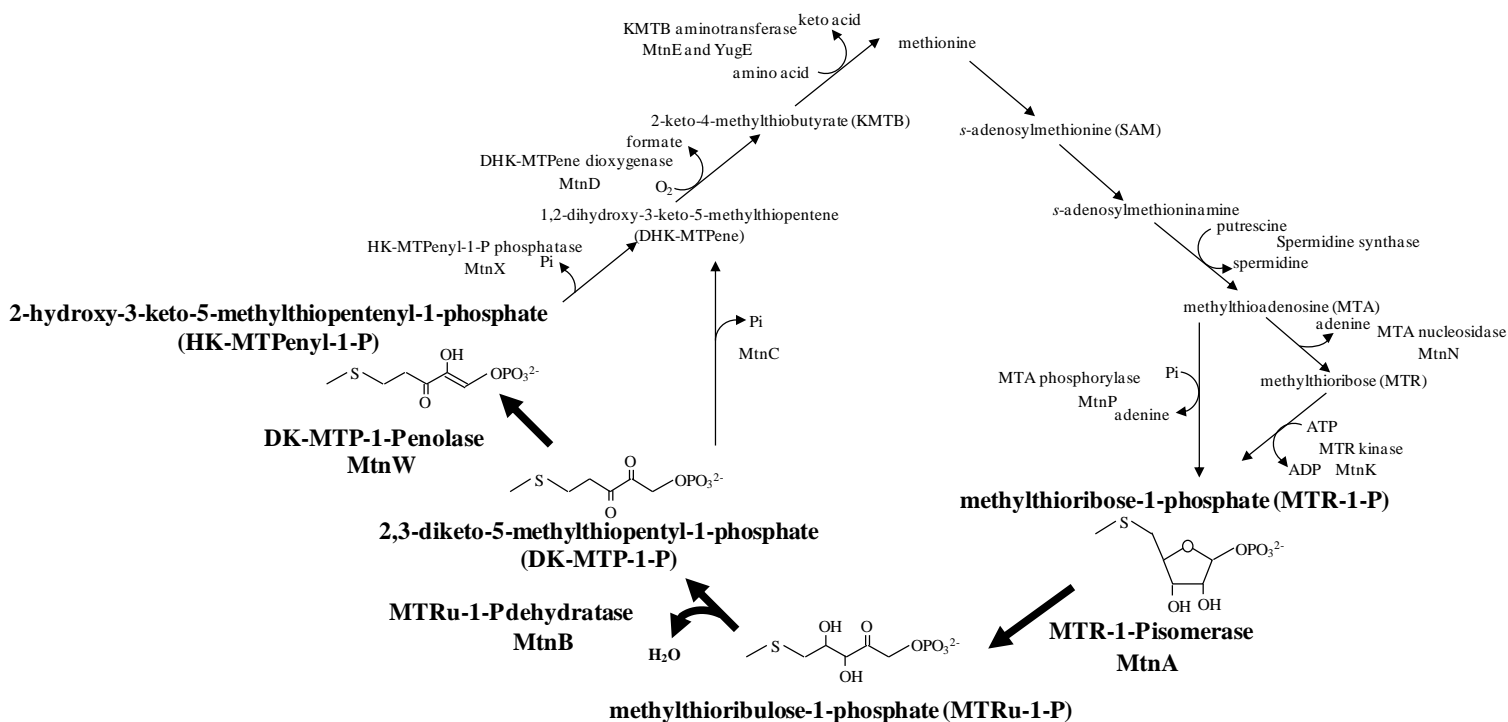


Figure 1-1 メチオニン還元硫黄再生経路

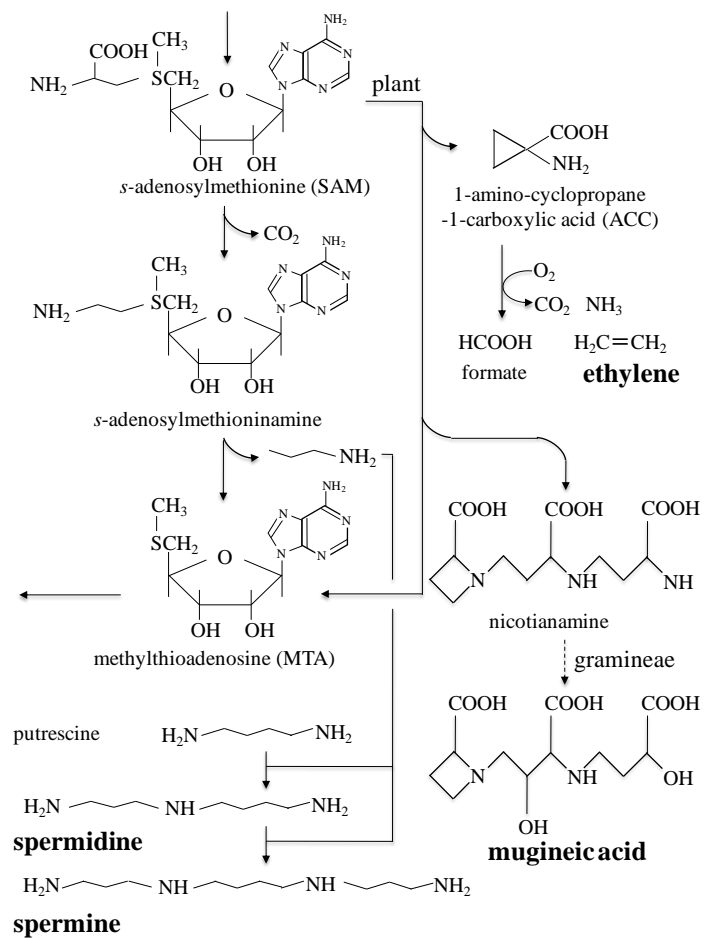
本論文で解析した酵素と代謝産物を太字で示した。

枯草菌 *Bacillus subtilis* のメチオニン還元硫黄再生経路では、まず MTA がヌクレオシダーゼ (MtnN) によりアデニンとメチルチオリボース (MTR) に加水分解され、この MTR が MTR キナーゼ (MtnK) によりメチルチオリボース 1-リン酸 (MTR-1-P) へリン酸化される。MTR-1-P は MTR-1-P イソメラーゼ (MtnA) によりメチルチオリブローース 1-リン酸 (MTRu-1-P) へ異性化され、引き続き MTRu-1-P は MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) により脱水され、2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸 (DK-MTP-1-P) へ変換される。DK-MTP-1-P は DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) によるエノール化によって 2-ヒドロキシ 3-ケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸 (HK-MTPenyl-1-P) に変換され、HK-MTPenyl-1-P ホスファターゼ (MtnX) による脱リン酸化を経て 1,2-ジヒドロキシ 3-ケト 5-メチルチオペンテン (DHK-MTPene) に変換される。DHK-MTPene は DHK-MTPene ジオキゲナーゼ (MtnD) による酸化を受けて、ギ酸と 2-ケト 4-メチルチオブチレート (KMTB) に変換され、最後に KMTB が KMTB アミノトランスフェラーゼ (MtnE または YugE) によるアミノ基の転移を受けてメチオニンに再生される。

動物や微生物の一部では、*B. subtilis* とは異なり、MTA のアデニンを加リン酸分解することで、1 段階で MTA から MTR-1-P を生成する MTA ホスホリラーゼ (MtnP) を有しているもの、DK-MTP-1-P に対してエノラーゼ反応とホスファターゼ反応の両反応を 1 酵素で行う DK-MTP-1-P エノラーゼ/ホスファターゼ (MtnC) を有している生物が報告されている (Fig. 1-1)。MtnP や MtnC を持つ生物は、同じ反応段階をそれぞれ 2 酵素ずつ MtnN と MtnK、MtnW と MtnX で触媒している *B. subtilis* よりもメチオニン還元硫黄再生経路を構成する代謝酵素が少ないと考えられている。この生物種による代謝酵素の違いは医学に応用されている。MTR は *B. subtilis* と同じく MtnN と MtnK が働くマラリア原虫には取り込まれるが、MTA から MTR を介さずに MTR-1-P を生成する MtnP が働く哺乳類では代謝されないために、MTR アナログで抗マラリア薬が作製された (Riscoe et al., 1988)。また、癌や神経疾患で MtnP の活性が特異的に増加することが知られており、癌治療においても注目を浴びている経路である (Christopher et al., 2002)。植物において、メチオニン還元硫黄再生経路は植物ホルモンのエチレンや鉄キレート剤であるムギネ酸の合成にも関わっていると考えられている (Negishi et al., 2002) (Fig. 1-2)。メチオニン還元硫黄再生経路の研究は *Klebsiella pneumoniae* において進んでおり、酵素活性や反応中間体の同定から、反応経路が予想された (Furfine and Abeles, 1988)。各酵素をコードする遺伝子は *mtnN* が 1999 年に (Cornell and Riscoe, 1999)、*mtnK* が 2001 年に (Sekowska et al., 2001)、*mtnP* が 1996 年に (Della Ragione et al., 1996)、MtnC が 1993 年に (Balakrishnan et al., 1993)、*mtnD* が 2001 年に (Dai et al., 2001)、*mtnE* が 1999

年に同定された (Heilbronn et al., 1999)。その後 *B. subtilis* が持つ残る 4 段階の反応を触媒する酵素遺伝子、*mtnA*、*mtnB*、*mtnW*、*mtnX* を当研究室において初めて同定した (Ashida et al., 2003)。中でも MTR-1-P イソメラーゼ (MtnA)、MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB)、DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) の 3 酵素は、アミノ酸配列において他の機能を持つタンパク質、それぞれ、真核型翻訳開始因子 eIF2B $\alpha$ 、糖代謝酵素アルドラーゼ、CO<sub>2</sub> 固定酵素 RuBisCO と相同性を示し、かつ同じ物質を基質とする酵素が他に報告されていないというユニークな特徴を持つことから、*B. subtilis* リコンビナントタンパク質を用いて酵素学的諸性質を決めると共に、反応機構を解析した。それぞれ第 2 章で MTR-1-P イソメラーゼを、第 3 章で MTRu-1-P デヒドラターゼを、第 4 章で DK-MTP-1-P エノラーゼを解析し、それぞれの解析から明らかになったことについて述べる。

硫黄代謝系の研究は炭素や窒素などの代謝系の研究よりも遅れており、本研究で対象とした 3 酵素も、配列相同性からは機能のまったく異なるタンパク質に分類されていた。配列を基にした遺伝子の網羅的機能予測ではわからなかった、個々のユニークな反応機構や速度定数は、代謝系全体の制御機構を明らかにするのに役立つだけでなく、相同性を持つタンパク質間との進化的繋がりに大きな示唆を与えた。



**Figure 1-2** ポリアミン、エチレン、ムギネ酸合成とメチオニン還元硫黄回路

ポリアミン、エチレン、ムギネ酸それぞれの前駆体を合成した際にMTAが副次的に生じる。そのMTAをメチオニンに再生するのがメチオニン還元硫黄再生経路である。

## 第2章

### メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼの解析



## 2-1 序論

メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼは、メチルチオリボース 1-リン酸 (MTR-1-P) からメチルチオリブローース 1-リン酸 (MTRu-1-P) を生成するイソメラーゼ反応を触媒する (Fig. 2-1)。この酵素遺伝子の同定は、全生物を通じて *B. subtilis* で初めてあり、一位にリン酸基を持つ糖の開環反応を触媒する酵素という点でも初めての報告であった。

興味深いことに、*B. subtilis* の MTR-1-P イソメラーゼである MtnA は、アミノ酸配列において真核型翻訳開始因子 eIF2B の  $\alpha$  サブユニットと約 20% の相同性を示すことから、eIF2B $\alpha$ -like protein (eIF2B $\alpha$ -LP) とアノテーションされ (Yamaguchi et al., 2000) (Fig. 2-2)、機能同定以前は翻訳に関わるタンパク質と予想されていた。eIF2B は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  の 5 つのサブユニットから成る 5 量体を形成し、真核生物の翻訳開始過程において鍵ステップとなる eIF2 の GTP/GDP 交換 (GEF) 反応を行っている (Webb et al., 1997; Proud et al., 2005) (Fig. 2-3)。GTP 結合型 eIF2 (eIF2-GTP) は、40S リボソームに開始メチオニン tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) を eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 複合体として運び、翻訳が開始される。その後 eIF2-GTP の GTP が加水分解を受け eIF2-GDP になり、40S リボソーム複合体から解離する。次の翻訳開始反応のために eIF2-GDP は eIF2B の GEF 反応により eIF2-GTP に変換される。

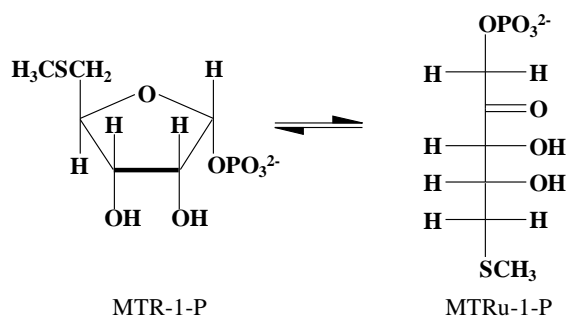


Figure 2-1. MTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) の触媒反応

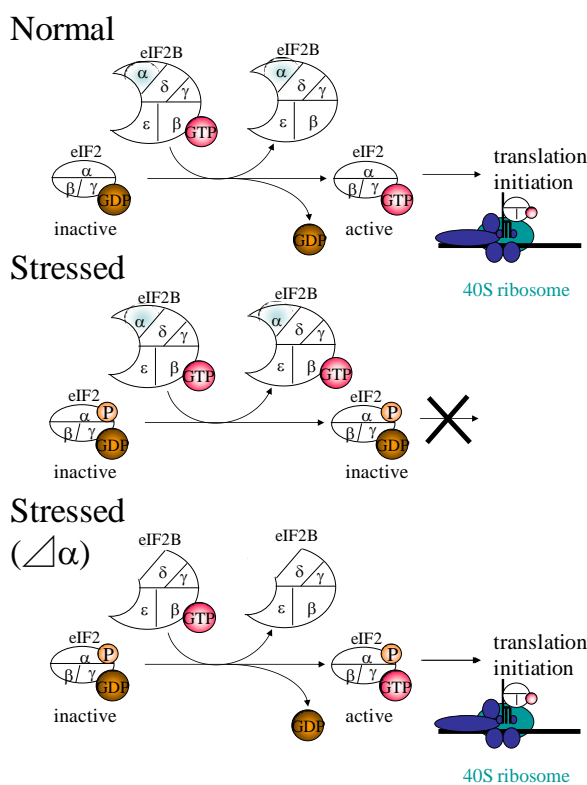
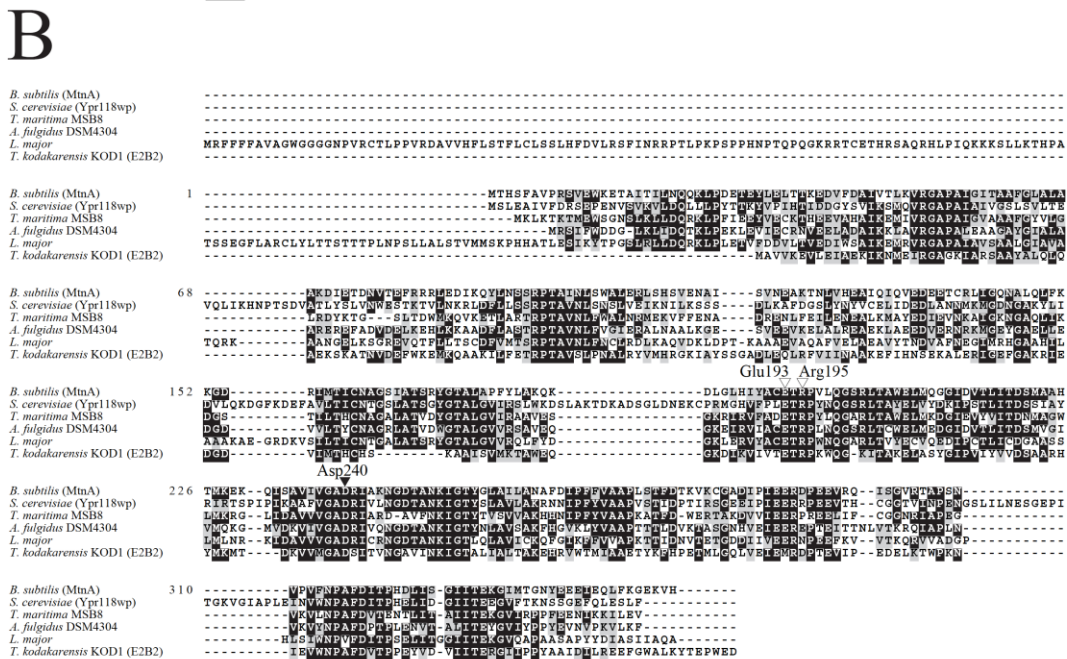
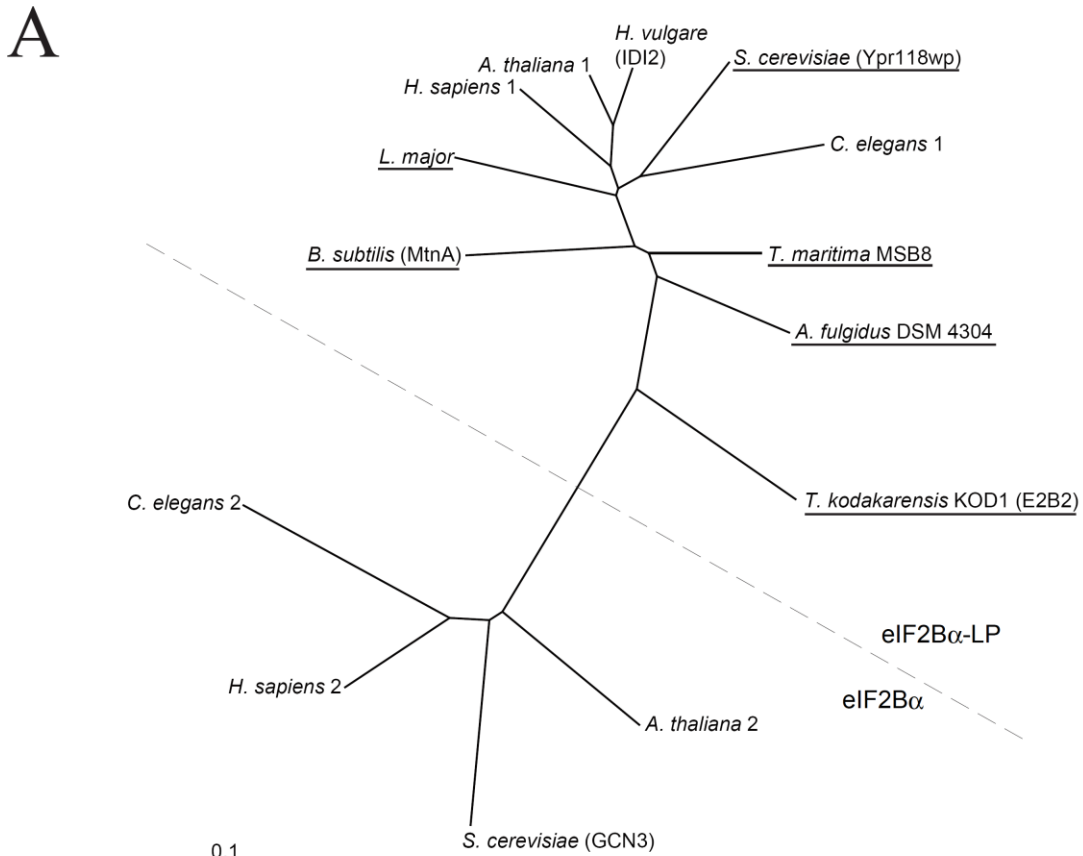


Figure 2-3. eIF2B $\alpha$ の機能

(上段) eIF2Bは $\alpha$ から $\epsilon$ までの5つのサブユニットで構成されている。eIF2Bは不活性状態のGDP結合型eIF2のGDPをGTPに交換することで、eIF2の活性化を行い、翻訳を開始される。(中段) 飢餓や重金属、小胞体ストレスなどによって、eIF2の $\alpha$ サブユニットはリン酸化される。リン酸化されたeIF2に対してはeIF2BはGDP/GTP交換活性を持たず、翻訳は開始されない。(下段)  $\alpha$ サブユニットを欠失したeIF2B複合体は、リン酸化されたeIF2に対してもGDP/GTP交換を行い、翻訳を開始させる。



**Figure 2-2. MTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) と相同タンパク質の相同性**

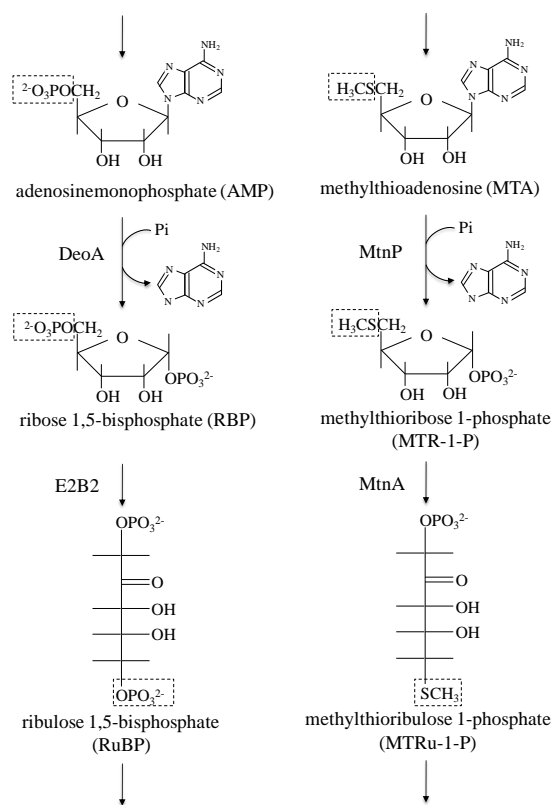
(A) MtnAの推定アミノ酸配列を他の生物が持つ相同タンパク質のアミノ酸配列を比べた。*Homo sapiens* (*H. sapiens* 1, NP\_001026897)、*Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana* 1, At2g05830)、*Hordeum vulgare subsp. vulgare* (BAB21393)、*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans* 1, NP\_506714)、*Saccharomyces cerevisiae* (Ypr118wp, NP\_015443)、*Leishmania major* (CAJ09465)、*Thermotoga maritima* MSB8 (NP\_228719)、*Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304 (NP\_069206)、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 (YP\_182598)、また真核型翻訳開始因子eIF2Bαでは*H. sapiens* (*H. sapiens* 2, NP\_001405)、*A. thaliana* (*A. thaliana* 2, At1g72340)、*C. elegans* (*C. elegans* 2, NP\_499106)、*S. cerevisiae* (GCN3)の4種を用いた。(B) (A)で下線を引いたタンパク質を用いたマルチプルアラインメント。同一アミノ酸は黒で、類似アミノ酸は灰色で反転してある。二量体形成に関わるアミノ酸を白三角で、推定触媒残基を黒三角で示した。アミノ酸の番号は*B. subtilis*のMtnAを基準にした。

種々のストレスで eIF2 の  $\alpha$ サブユニットがリン酸化されるとこの GEF 反応が起こらず、翻訳が開始されない (Fig. 2-3)。しかし、eIF2B $\alpha$ を欠失した eIF2B 複合体では、リン酸化された eIF2 に対しても GEF 反応を行うことから、eIF2B  $\alpha$ は GEF 反応には必須ではなく、eIF2 のリン酸化を認識し、翻訳を調節する役割があると考えられているが、その立体構造や認識機構は未だに明らかになっていない。その翻訳調節因子 eIF2B $\alpha$ と相同性を示す eIF2B $\alpha$ -LP に属する *B. subtilis* MtnA が硫黄代謝経路で働く MTR-1-P イソメラーゼと同定されたことは驚くべき事実であった。

さらに、我々の MtnA の機能同定に引き続き、近年、超高熱性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* の eIF2B $\alpha$ -LP に属する E2B2 がリボース 1,5-ビスリン酸 (RBP) イソメラーゼとして同定された (Sato et al., 2007) (Fig. 2-2、4)。この酵素は、*T. kodakaraensis* において CO<sub>2</sub> 固定反応を触媒するリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) の基質リブローズ 1,5-ビスリン酸 (RuBP) を RBP から合成する反応を触媒している。この発見によって、*T. kodakaraensis* RuBisCO の基質 RuBP が アデノシンモノリン酸 (AMP) から RBP を介して合成されるという、まったく新規の CO<sub>2</sub> 固定経路が提唱された。この報告は、古細菌における炭素代謝経路を大きく描きかえただけではなく、MTR-1-P イソメラーゼ以外に知られていなかった一位にリン酸基を有する環状糖イソメラーゼの重要性を示すことになった。

このような研究の流れから、eIF2B $\alpha$ -LP ファミリーは翻訳開始に関わる eIF2B $\alpha$ とは異なり、一位にリン酸基を有する環状糖のイソメラーゼとして機能していることが明らかとなっていった。しかしながら、これまでに、eIF2B $\alpha$ -LP ファミリーに属する新規な環状糖リン酸イソメラーゼの酵素学的解析は行われていなかった。

アルドース型環状糖の異性化反応に

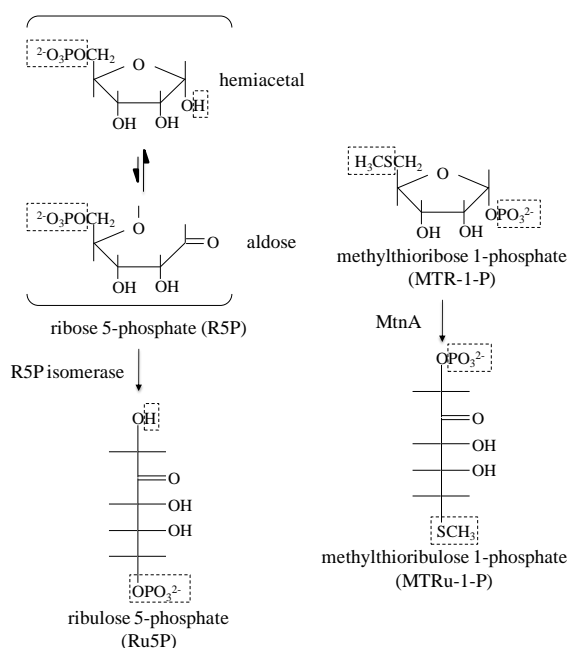


**Figure 2-4. AMP経路とメチオニン還元硫黄再生経路との比較**

(左) *Thermococcus kodakaraensis*のAMP (アデノシンモノリン酸) 経路。AMPに対して加リン酸分解酵素DeoAがRBP (リボース1,5-ビスリン酸) を生成する反応を触媒し、続いてMtnAと同じくeIF2B $\alpha$ -LPに属するE2B2が異性化により、RBPからRuBP (リブローズ1,5-ビスリン酸) を生成する。

(右) メチオニン還元硫黄再生経路の一部。DeoAとMtnP、E2B2とMtnAの触媒する反応がそれぞれ似ている。点線は両代謝経路の相違部位。

は大きく 2 つの反応段階が知られている。第一段階は、一位の炭素がアルドース型を取ることにより、環が開裂する反応である (Fig. 2-5)。この反応は平衡反応であるために、多くの場合、酵素とは独立しておこる。続いておきるのが、アルドース型からプロトンの転移を伴いケトース型となる異性化反応である。MTR-1-P の場合、一位にリン酸基を有しているため、平衡反応で開環状態をとることができない。そのため、MTR-1-P イソメラーゼにおいて、これまでに報告されている一般のイソメラーゼとは異なる、新しい反応機構の存在が考えられ、その酵素学的性質に興味を持たれた。そこで、eIF2B $\alpha$ と配列相同性を持ち、新規な反応機構を有することが予想される MTR-1-P イソメラーゼの酵素学的性質の解析を行ったので、その結果について報告する。この報告が、一位にリン酸基を有する環状糖のイソメラーゼの酵素学的性質について述べる初めての論文である。



**Figure 2-5. R5PイソメラーゼとMTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) との比較**

(左) R5P (リボース5-リン酸) イソメラーゼ。水溶液中では開環型でない場合が多く、分子内のC1位のアルデヒド基とC4位のヒドロキシル基が反応して分子内ヘミアセタールを生成している。  
(右) MTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) C1位にリン酸基があるために、開環型をとることができない。点線は両酵素の基質/生成物における相違部位。

## 2-2 材料と方法

### 用いた菌株と培養条件

*Bacillus subtilis*168 (*trp* C2) と *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 及び BL21 (DE3) は Luria-Bertani 培地 (LB 培地) において 37°C、250 ppm で攪拌しながら培養した。抗生物質アンピシリンまたはクロラムフェニコールが培養に必要な場合は、それぞれ 50  $\mu$ g/ml、30  $\mu$ g/ml となるように培地に添加した。

### リコンビナントタンパク質の合成

LB 培地で生育させた *B. subtilis* の菌体から定法に従ってゲノム DNA を調整した (Saunders et al., 1984)。調整したゲノム DNA に対して、増幅産物にそれぞれ制限酵素サイト *Nde*I と *Bam*HI を付加されるように設計したプライマー GGAATTCCATATGACCCATTCATTTGCTG (下線部が *Nde*I サイト) と CGGGATCCAAATGAGCAAAGTCC (下線部が *Bam*HI サイト) を *mtnA*、GGTACACCATATGGCTGCAAAACAAGAACG (下線部が *Nde*I サイト) と GCGGATCCTTATTTAACAGCTGATGCTCGAGTG (下線部が *Bam*HI サイト) を *mtnB*、GAGCTCTCATATGAGTGAGTGAGTTATTAG (下線部が *Nde*I サイト) と GCGGATCCTCCATACGGCTTC (下線部が *Bam*HI サイト) を *mtnW* 増幅のために用い PCR を行った。PCR は KOD DNA ポリメラーゼ (TOYOBO、JAPAN) を用い、98 度を 15 秒、55 度を 4 秒、74 度を 75 秒のサイクルを 30 回繰り返した。PCR 産物を *Eco*RV により切断した pBC ベクター (Stratagene、USA) にサブクローニングし、シークエンシングにより配列の確認を行った。サブクローニングした pBC ベクターから *Nde*I と *Bam*HI 制限酵素処理によって調整した目的 DNA 断片を、pET15b (Novagen、USA) の *Nde*I と *Bam*HI 部位へ挿入した。完成した発現ベクターを用いて *E. coli* BL21 (DE3) の形質転換を行った。

### リコンビナントタンパク質の発現と精製

それぞれの発現ベクターを有する *E. coli* BL21 (DE3) を 1 mM のイソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した液体 LB 培地において一晚培養を行った。回収した菌体を 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.1)、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を含む抽出バッファーに懸濁し、超音波破碎により粗酵素溶液を調整した。粗酵素溶液中の His 融合リコンビナントタンパク質を His-bind レジン (Novagen、USA) を用いて精製をした。*MtnB*、*MtnW* は PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare、Japan) を用いて 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.1)、1 mM MgCl<sub>2</sub> にバッファー交換を行った。*MtnA* は PD-10 脱塩カラムを用いて 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.1)、150 mM NaCl、2.5 mM CaCl<sub>2</sub> にバッファー交換を行い、このタンパク質溶液にトロンビンを添加し、室

温で一晩処理することにより His-tag を切断した。トロンビン処理を行ったタンパク質溶液を 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.1)、1 mM MgCl<sub>2</sub> で平衡化した Superose 6 10/300 GL カラム (Amersham Pharmacia、USA) に供し、His-tag が切断された MtnA 溶出画分を回収した。タンパク質の濃度測定にはブラッドフォード法を用いた。リコンビナントタンパク質の精製度は SDS-PAGE により確認した。

### MTR-1-P の調整、MTR-1-P と MTRu-1-P の定量

S-アデノシルメチオニン (SAM) のアデニンを塩酸により加水分解した後に、MtnK の触媒反応により C1 にリン酸基を付与し MTR-1-P を合成した。合成した MTR-1-P は MonoQ HR16/10 カラム (Amersham Pharmacia、USA) により精製した後に Sephadex G-10 カラム (2.6 x 65 cm、Amersham Pharmacia、USA) に供し、脱塩を行った。

イソメラーゼ反応後の MTR-1-P と MTRu-1-P の混合溶液を 100 mM NaOH で平衡化した CarboPac PA1 カラム (Dionex、Japan) に供し、0 M から 0.5 M への酢酸カリウムの直線的なグラジエントで分離した。分離回収した MTR-1-P と MTRu-1-P はリン酸定量キット (Phosphor C、Wako、Japan) を用いてリン酸濃度を測定後、各濃度を算出し、平衡定数を求めた。

### MTR-1-P イソメラーゼ活性測定

MTR-1-P イソメラーゼ (MtnA) の活性は MTRu-1-P デヒドラターゼである MtnB と 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼである MtnW とのカップリング系で測定した (Ashida et al., 2003; Carré-Mlouka et al., 2006; Saito et al., 2007)。MTRu-1-P は MtnB と MtnW により、280 nm に吸収極大を持つ 2-ヒドロキシ 3-ケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸 (HK-MTPenyl-1-P) に変換されるために、分光学的に反応速度を計測できる。特に断りのない限り、それぞれ 0.5 µg の MTR-1-P イソメラーゼ、5 µg の MtnB と 15 µg の MtnW を含み、50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.1)、1 mM MgCl<sub>2</sub> になるように調整したバッファーに、終濃度が 2 mM になるように MTR-1-P を加えることで反応を開始させた。総量は 1 ml で測定温度は 35 度で行った。<sup>1</sup>H-NMR 解析において、加えた MTR-1-P のほぼ全てが HK-MTPenyl-1-P に変換されていたことから、反応は強く HK-MTPenyl-1-P に傾いていると考えられた。このようにして求めた HK-MTPenyl-1-P の分子吸光係数は 9500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> であった。なお活性測定系におけるカップリング酵素は本実験のどの条件においても反応を律速していないことを確認した。MTR-1-P イソメラーゼの活性はフェリシアナイド還元糖定量法 (Avigad, 1975) またはシステインカルバゾール法 (Dische and Boresfreund, 1951)

によっても測定した。

### ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子質量解析

50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.1)、150 mM NaCl で平衡化した Superose 6 10/300 GL カラム (Amersham Pharmacia, USA) に His-tag を切断した MTR-1-P イソメラーゼを供し、同バッファーで溶出させた。同様に Gel Filtration Calibration kit (Amersham Pharmacia, USA) のフェリチン (440 kDa)、アルドラーゼ (158 kDa)、オバルブミン (43 kDa)、リボヌクレアーゼ A (13.7 kDa) の溶出バッファー量を測定し、分子質量を求めた。

### MTR-1-P イソメラーゼ反応産物の NMR 解析

Bruker DRX-800 spectrometer (Bruker, Germany) を用いて 298 K、800 MHz の条件で NMR 解析を行った (Ashida et al., 2003)。MTR-1-P は 16 時間凍結乾燥を行い、未開封の 99.9% D<sub>2</sub>O (Wako, Japan) に溶解した。リコンビナント MTR-1-P イソメラーゼを重水リン酸バッファー (pD 7.5) で平衡化した NAP-5 カラム (Amersham Pharmacia, USA) を用いてバッファー交換を行うことにより、酵素中に含まれる H<sub>2</sub>O を除いた。D<sub>2</sub>O 溶解後の MTR-1-P を重水リン酸バッファーに交換した MTR-1-P イソメラーゼに加え、25 度で 12 時間反応させた。

### MTR-1-P イソメラーゼ反応産物の MS 解析

リボース 5-リン酸 (R5P, SIGMA-ALDRICH, USA) もしくは凍結乾燥後の MTR-1-P を、99.9% D<sub>2</sub>O 溶液 (Wako, Japan) で調整した 50 mM トリス塩酸バッファーに溶解し基質として用いた。R5P イソメラーゼ (SIGMA-ALDRICH, USA) は、D<sub>2</sub>O トリスバッファーに終濃度が 1 mM となるように MgCl<sub>2</sub> を加えた溶液に溶解した。MTR-1-P イソメラーゼは、D<sub>2</sub>O バッファーで平衡化した NAP-5 カラム (Amersham Pharmacia, USA) を用いてバッファー交換を行った。D<sub>2</sub>O バッファーに溶解した MTR-1-P イソメラーゼ、もしくは R5P イソメラーゼを 10 µg 含む D<sub>2</sub>O バッファーに、終濃度が 1 mM になるように重水に溶解した MTR-1-P、もしくは R5P をそれぞれ加え、総量を 100 µl とし、37 度で 1 時間インキュベートした。反応後、Centricon YM-3 vial (Millipore, USA) によってタンパク質を除去した。反応産物を 16 時間凍結乾燥し、MiliQ 水に溶解後、ESI イオントラップ MS (Bruker Daltonics, Germany) を用いて質量を測定した。

## 2-3 結果

現在まで MTR-1-P イソメラーゼの酵素学的性質については全く報告例がない。そこで *B. subtilis* の MTR-1-P イソメラーゼの酵素学的特徴づけを行った (Table 2-1)。ゲルろ過クロマトグラフィーから求められた精製酵素の分子質量は 76 kDa で、アミノ酸配列から推定された単量体の分子質量が 38.9 kDa であるため、MtnA がホモダイマーを形成していることがわかった (Fig. 2-6)。

MTR-1-P から MTRu-1-P を合成する順方向の活性は pH 8.1、35 度で最大となり、それよりも高い pH や温度で急激に減少した (Table 2-1)。アレニウスプロットから求められたイソメラーゼ反応における活性化エネルギー  $E_a$  は  $68.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  であった。イソメラーゼ活性は MTR-1-P の濃度依存的に増加し、 $V_{\max}$  と MTR-1-P に対する  $K_m$  は、それぞれ  $20 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ 、 $0.14 \text{ mM}$  であった。そこから求められる代謝回転数  $k_{\text{cat}}$  は  $13 \text{ turnovers sec}^{-1} \text{ site}^{-1}$  であり、触媒効率  $k_{\text{cat}}/K_m$  は  $9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  であった。

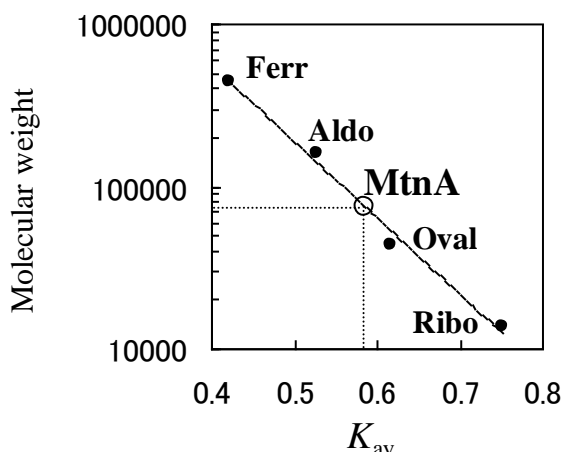
これまでに、アルドース/ケトースイソメラーゼの活性に金属が重要であることが報告されていたことから、MtnA の活性に金属が必要かどうかを検証するために、 $100 \text{ mM EDTA}$  を含む  $50 \text{ mM}$  トリス塩酸バッファー (pH 8.1) 中で MTR-1-P イソメラーゼを 4 度で 10 時間静置し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより EDTA フリーバッファー ( $50 \text{ mM}$  トリス塩酸バッファー (pH 8.1)) に置換し、金属除去操作を行った。MtnA の金属除去処理後の活性を還元糖定量法お

**Table 2-1.** Molecular and catalytic properties of recombinant MTR-1-P isomerase

| Parameter                         | Value or description  |
|-----------------------------------|---|
| $V_{\max}$                        | $20.4 \pm 0.8 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1b}$ |
| $K_m$                             | $138 \pm 9 \text{ } \mu\text{M}^b$                                      |
| $K_{\text{cat}}$                  | $13 \text{ sec}^{-1} \text{ site}^{-1}$                                 |
| Optimum pH                        | 8.1   |
| Optimum temperature               | $37 \text{ }^\circ\text{C}$   |
| Activation energy                 | $68.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  |
| Metal                             | Not needed  |
| Equilibrium constant <sup>a</sup> | 6.0   |
| Native molecular mass             | 76 kDa  |
| Subunit molecular mass            | 38.9 kDa  |
| Suggested composition             | homodimer   |

<sup>a</sup>  $[\text{MTRu-1-P}] / [\text{MTR-1-P}]$

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  SE from three independent measurements



**Figure 2-6.** MTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) の分子質量

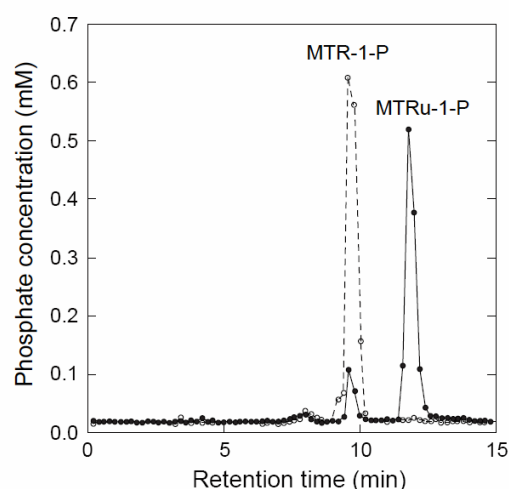
精製したMTR-1-Pイソメラーゼをゲルろ過に供し、分子質量を求めた。標準タンパク質には、フェリチン (440 kDa)、アルドラーゼ (158 kDa)、オバルミン (43 kDa)、リボヌクレアーゼA (12.6 kDa) を用いた。分配係数 ( $K_{\text{av}}$ ) = (溶出体積 ( $V_e$ ) - 排除体積 ( $V_o$ )) / (ベット体積 ( $V_t$ ) - 排除体積 ( $V_o$ ))



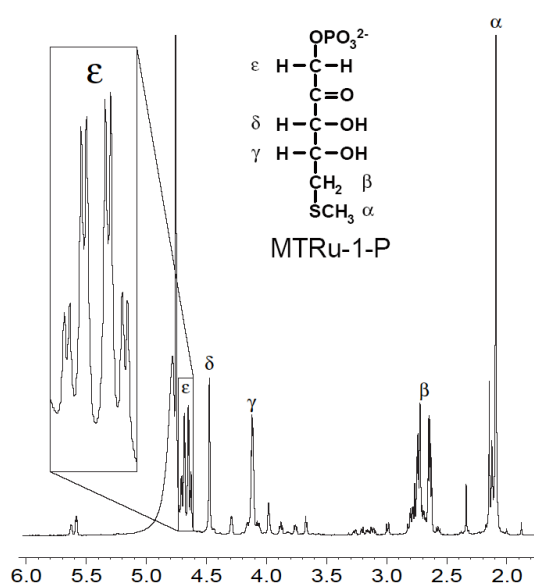
よびシステインカルバゾール反応によって測定した結果、MtnA は触媒に金属を要求しないことがわかった。

MTR-1-P と MTRu-1-P の平衡定数を決定するため、1  $\mu\text{g}$  の MTR-1-P イソメラーゼと 15  $\mu\text{mol}$  の MTR-1-P を反応させた溶液を CarboPac PA1 カラムを用いて分離し、MTR-1-P と MTRu-1-P 溶出画分を回収した後に、リン酸定量によって反応後の MTR-1-P と MTRu-1-P の量を求めた。反応は 40 分で平衡に達し、4 時間後の反応溶液における MTR-1-P と MTRu-1-P 画分に含まれるリン酸量を測定した (Fig. 2-7)。4 時間後の MTR-1-P と MTRu-1-P は、カラムに供した総リン酸量のそれぞれ  $14.3 \pm 0.6\%$ 、 $85.7 \pm 4.8\%$  に相当した。4 時間後における量比は平衡定数を示しており、求められた平衡定数  $[\text{MTRu-1-P}] / [\text{MTR-1-P}]$  は 6.0 であった (Table 2-1)。実際、MTR-1-P と MtnA を重水で作成したリン酸バッファー中で反応させた生成物の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル像からも、反応産物のほとんどが MTRu-1-P であり、HPLC で決定した平衡定数の結果と良く一致していた (Fig. 2-7、2-8)。 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル像では MTRu-1-P の全てのピークが同定できた。それぞれのピークは、2.09 (m, 3H, 6- $\text{CH}_3$ )、2.64 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 14.1 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3 \text{ Hz}$ , 5- $\text{CH}_2$ )、2.73 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 14.1 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 4.5 \text{ Hz}$ , 5- $\text{CH}_2$ )、4.11 (dt,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3, 4.8 \text{ Hz}$ , 4- $\text{CH}$ )、4.47 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0 \text{ Hz}$ , 3- $\text{CH}$ )、4.64 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 18.9 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HP}} = 6.3 \text{ Hz}$ , 1- $\text{CH}_2$ )、4.70 ppm (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 18.9 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HP}} = 6.0 \text{ Hz}$ , 1- $\text{CH}_2$ ) としてアサインされた。

ここで大変興味深いことに、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおいて MTRu-1-P の C1 のプロトンに対応するスペクトルピークは、2つのピークがリンと C3 のプロトン



**Figure 2-7. MTR-1-Pイソメラーゼ反応の平衡定数**  
MTR-1-PとMtnAを4時間反応させた後に反応溶液をCarboPac PA1に供し、反応産物を分離した。リン酸濃度はリン酸定量キットによって求めた。



**Figure 2-8. 重水中で反応させた場合のMTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) の反応産物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル像**  
MTR-1-PとMtnAを重水リン酸バッファー中で反応させ、平衡に達した溶液を $^1\text{H-NMR}$ により解析した。挿入図はC1に結合する水素に対応するスペクトルの拡大図である。

の影響で2回開裂していた (Fig. 2-8 挿入図)。このことは、C1 には2つのプロトンが存在していることを示している。MTR-1-P イソメラーゼ反応では C2 から C1 へのプロトンの転移がおこるが、イソメラーゼ反応中に転移するプロトンが溶媒中の重水素と交換しなかったことが示唆された。多くの糖イソメラーゼの反応機構はエンジオール機構であり、一般にエンジオール機構のイソメラーゼ反応では、溶媒中のプロトンが生成物に取り込まれる (Fig. 2-9)。そのため、MtnA において溶媒中にプロトンが生成物に取り込まれていなかったことから、エンジオール機構とは異なる反応機構を用いている可能性が考えられた。そこで、さらに MtnA のイソメラーゼ反応生成物中に重水素が取り込まれるかどうかを検証するために、重水で作成したバッファー中で反応させた

MtnA 反応産物の質量を MS により測定した。実験の結果、モノアイソトピック質量+1 の割合は、

MTR-1-P と MTR-1-P に MtnA を加えた反応溶液で変化がなく、モノアイソトピック質量+1 のモノアイソトピック質量に対する比率は、安定同位体の存在率の理論値 (7.7%) と近い値を示した (Table 2-2)。この結果は、NMR スペクトルの結果と一致し、MtnA のイソメラーゼ反応ではプロトン転移の際に溶媒中の重水素との交換が起っていないことを示していた。一方で、コントロールとして行った、生成物に溶媒中のプロトンを取り込むエンジオール機構により触媒を

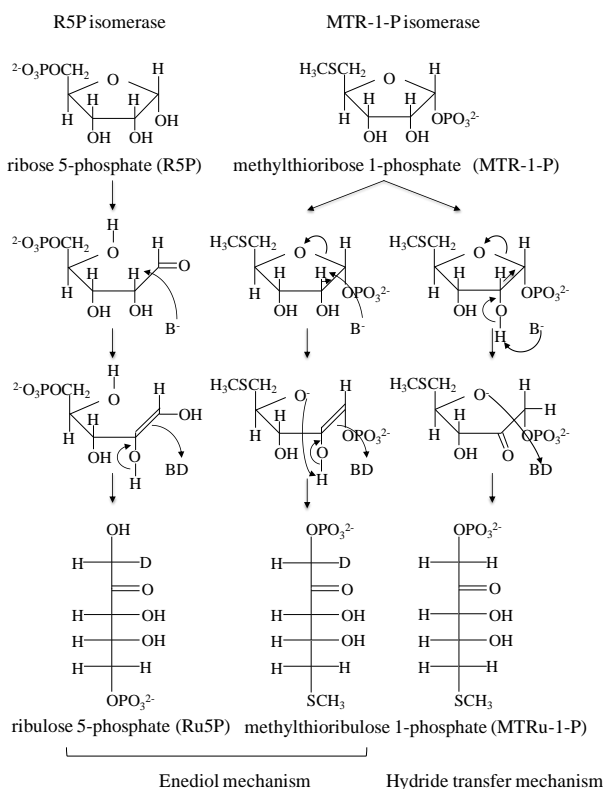


Figure 2-9. R5PイソメラーゼとMTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) との反応機構の比較

(左) R5P (リボース5-リン酸) イソメラーゼの反応機構。エンジオール機構であるから、重水中で反応させた場合には生成物に重水素が取り込まれる。(中) MTR-1-Pイソメラーゼがエンジオール機構であった場合の反応機構モデル。生成物のC1位に重水素が取り込まれる。(右) MTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) がヒドリド転移機構であった場合。C1位に重水素は取り込まれない。

Table 2-2. The percentage of molecular mass plus one after the reaction in D<sub>2</sub>O buffer

| Sample                            | Relative intensity of MM +1 (%) <sup>a</sup> |
|-----------------------------------|--|
| MTR-1-P (no enzyme)               | 7  |
| MTR-1-P + MtnA                    | 9  |
| Ribose-5-P (no enzyme)            | 6  |
| Ribose-5-P + ribose-5-P isomerase | 32   |

<sup>a</sup> The intensity of the monoisotopic molecular mass (MM) normalized to 100.

行う R5P イソメラーゼでは、反応生成物でモノアイソトピック質量+1の割合が 32%であり、安定同位体の存在率の理論値と比較して顕著に増加していた。このことから、エンジオール機構で触媒を行う R5P イソメラーゼでは重水素が取り込まれたことが確かめられた (Rose, 1975; O'Donoghue et al., 2005ab; Berrisford et al., 2006)。なお、エンジオール機構のイソメラーゼであっても生成物全てに溶媒中の重水素が取り込まれることはなく、その溶媒中のプロトン取り込み効率は酵素によって異なることが知られている (Rose, 1975)。MtnA において  $^1\text{H-NMR}$  と MS 解析の結果から、溶媒中のプロトンを生成物にほとんど取り込まないことから、MtnA がエンジオール機構とは異なる反応様式でイソメラーゼ反応を行っていることが予想され、この結果は MTR-1-P イソメラーゼの反応機構が一般の糖イソメラーゼとは異なり、特殊な反応機構で触媒を行う糖リン酸イソメラーゼであることを示すものであった。

## 2-4 考察

MTR-1-P イソメラーゼである MtnA と相同性を示すタンパク質は真核生物、原核生物、古細菌、全ての生物界に存在し、大きなファミリーを形成している。これらのタンパク質のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成すると、eIF2B $\alpha$ と MtnA を含む eIF2B $\alpha$ -LP の2つのクレードに分かれる (Fig. 2-2A)。eIF2B $\alpha$ に分類される真核生物のタンパク質は、eIF2B $\alpha$ として機能していると考えられる。一方、eIF2B $\alpha$ -LP に属する *B. subtilis* の MtnA と酵母の Ypr118wp は MTR-1-P イソメラーゼとして同定されている (Ashida et al., 2003; Bumann et al., 2004)。Ypr118wp と立体構造が類似する *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304、*Thermotoga maritima* MSB8、*Leishmania major* の eIF2B $\alpha$ -LP や、真核生物の *Caenorhabditis elegans*、*Arabidopsis thaliana*、*Hordeum vulgare*、*Homo sapiens* の eIF2B $\alpha$ -LP が MTR-1-P イソメラーゼであるかは明らかとされていない。しかしながら、機能同定はされていないものの、*H. vulgare* の eIF2B $\alpha$ -LP である IDI2 は (Fig. 2-2A)、MtnA と同じメチオニン還元硫黄再生経路の代謝酵素である 1,2-ジヒドロキシ-3-ケト-5-メチルチオペンテンジオキシゲナーゼ (MtnD) と共にメチオニン還元硫黄再生経路を介してムギネ酸合成に関与していることが明らかとなっていることから (Fig. 1-1、1-2)、IDI2 は MTR-1-P イソメラーゼとして機能していると考えられる (Yamaguchi et al., 2000)。また、古細菌 *T. kodakaraensis* における eIF2B $\alpha$ -LP である E2B2 が MTR-1-P と構造の良く似た RBP を基質とするイソメラーゼとして同定された (Sato et al., 2007) (Fig. 2-4)。これらのことから、未同定の eIF2B $\alpha$ -LP も MTR-1-P イソメラーゼまたは、類似基質に対してイソメラーゼ反応を触媒する酵素であると予想される。

本論文において、eIF2B $\alpha$ -LP に属する新規糖リン酸イソメラーゼの酵素学的特徴付けを行った。解析の結果から MtnA はホモダイマーとして機能していることがわかった。酵母 Ypr118wp もホモダイマーであることから (Bumann et al., 2004)、MTR-1-P イソメラーゼはホモダイマーを形成して機能していることが予想された。以上のことから、他の eIF2B $\alpha$ -LP ファミリーもホモダイマーを形成し、機能していると考えられた。

MTR-1-P と MTRu-1-P との平衡は MTRu-1-P に傾いており、平衡定数  $K_{eq}$  は 6.0 だった (Table 2-1、Fig. 2-7)。このことから 35 度における MTR-1-P から MTRu-1-P への標準自由エネルギー変化  $\Delta G^\circ$  は 4.6 kJ/mol と求められた。MTRu-1-P の自由エネルギーは MTR-1-P より低く安定であるが、その差は小さいと考えられた。

アルドースからケトースへの異性化反応には大きく2つの機構が存在する (Rose, 1975) (Fig. 2-9)。エンジオール型中間体を経るエンジオール機構とヒドリド (hydride) が直接移動するヒドリド移動機構である。エンジオール機構で

は、重水中で反応させた場合に、反応中に溶媒の重水素が生成物に取り込まれる (O'Donoghue et al., 2005ab) (Fig. 2-9)。一方ヒドリド移動機構では直接分子内でプロトンが移動するため、溶媒中のプロトンは取り込まれず、基質のプロトンが直接生成物に転移する (Rose, 1975; Allen et al., 1994; Fenn et al., 2004) (Fig. 2-9)。MTR-1-P と MTR-1-P イソメラーゼを重水中で反応させた場合、エンジオール機構で触媒を行う R5P イソメラーゼとは異なり、重水素の取り込みによる質量の増加がみられなかったことに加え、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル像より、重水素の取り込みが起こっていないことが明らかとなった (Fig. 2-8、Table 2-2)。ヒドリド移動機構でイソメラーゼ反応を行うことが明らかにされているキシロースイソメラーゼでは、C2 が  $^3\text{H}$  ラベルされたキシロースを基質に用いた解析から、反応生成物への溶媒プロトンの取り込みがほとんど起らず、基質由来の  $^3\text{H}$  がそのまま C2 から C1 へ転移することが報告されている (Rose, 1975)。この事実と我々の解析結果を考えるとキシロースイソメラーゼと同様に MtnA はヒドリド移動機構で反応を行っている可能性が高いと考えられた (Fig. 2-9)。

この可能性から、以下のように MTR-1-P イソメラーゼの反応機構モデルを考

えた (Fig. 2-10)。MTR-1-P が結合した後に、活性中心に配置するアスパラギン酸やグルタミン酸など負電荷アミノ酸によって O2 の水素が引き抜かれる。O2 の非共有電子対が C2 に移動し、カルボニル基を形成する。次に C2 から C1 の  $\delta^+$  にヒドリドが転移する。最後にプロトンを引き抜いたアミノ酸残基から O5 にプロトンが引き渡されて、開環が起こり、MTRu-1-P が生成する。この反応機構においてプロトンの引き抜きに関与するアミノ酸残基が重要であると考えられるが、MtnA や Ypr118wp の結晶解析から、Asp240 がこのプロトン引き抜き残基候補として有力であることが予想された (Tamura et al., 2008; Bumann et al., 2004)。興味深いことに MtnA や Ypr118wp の Asp240 に対応する残基は、MtnA、*T. kodakaraensis* RBP イソメラーゼ (E2B2) にも保存されている (Fig. 2-2B)。さらに機能同定されていない eIF2B $\alpha$ -LP に属するタンパク質全てにおいても Asp240 は保存されている。また、今回の解析から、MtnA の触媒活性には金属を必要としないことが明らかとなり、MtnA では、金属ではなく、特定のアミノ酸がベースとして働き、プロトンの授受に機能していると考えられた (Table 2-1)。これらの事実は、MTR-1-P イソメ

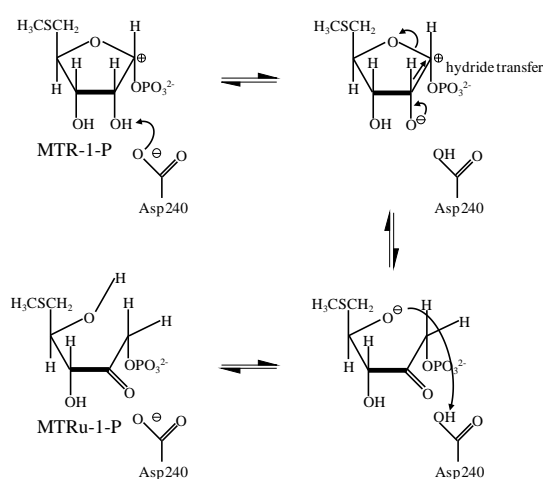


Figure 2-10. 予想されるMTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) の反応機構モデル

された (Tamura et al., 2008; Bumann et al., 2004)。興味深いことに MtnA や Ypr118wp の Asp240 に対応する残基は、MtnA、*T. kodakaraensis* RBP イソメラーゼ (E2B2) にも保存されている (Fig. 2-2B)。さらに機能同定されていない eIF2B $\alpha$ -LP に属するタンパク質全てにおいても Asp240 は保存されている。また、今回の解析から、MtnA の触媒活性には金属を必要としないことが明らかとなり、MtnA では、金属ではなく、特定のアミノ酸がベースとして働き、プロトンの授受に機能していると考えられた (Table 2-1)。これらの事実は、MTR-1-P イソメ

ラーゼである MtnA と Ypr118wp、*T. kodakaraensis* RBP イソメラーゼ、その他の eIF2B $\alpha$ -LP が Asp240 をプロトン授受残基に用いて環状糖のイソメラーゼ反応を行っていることを示しているのかもしれない。

MTR-1-P イソメラーゼ (MtnA) は真核型翻訳開始因子 eIF2B の $\alpha$ サブユニットと相同性があり、本研究で機能同定する以前はデータベース上では翻訳関連因子と記載されていた。実際は硫黄代謝経路で働く代謝酵素なので、eIF2B $\alpha$ とはまったく異なるタンパク質である。配列予測の限界を示す良い例と言える。一方で興味深いことに、酵母の eIF2B $\alpha$  (Gcn3) において MTR-1-P イソメラーゼで水素の引き抜きに関わっていると考えられた高度に保存されている Asp240 に相当するグルタミン酸をリジンに置換した変異体において Gcn3 の機能阻害を引き起こすことが報告されている (Bushman et al.,1993)。両酵素で共通して Asp240/Glu240 が活性に重要な役割を果たしているのかもしれない。現時点で、eIF2B $\alpha$ は eIF2 の $\alpha$ サブユニットのリン酸化を認識して翻訳を調節していると考えられているが、eIF2B $\alpha$ のリン酸化認識機構は明らかになっていない。一説としてリン酸化された eIF2 と結合した eIF2B が立体構造を変化させて GDP/GTP 交換反応を行う活性中心 (eIF2B の $\epsilon$ サブユニット) を基質である eIF2 $\alpha$ から遠ざけると言うモデルが提唱されている (Yang and Hinnebusch, 1996) (Fig. 2-11)。

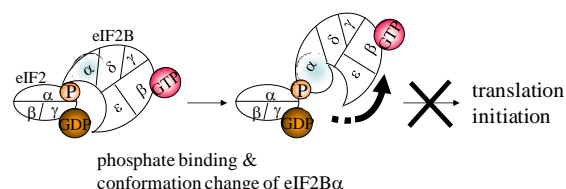


Figure 2-11. eIF2B $\alpha$ の構造変化モデル

リン酸化されたeIF2 $\alpha$ への結合がeIF2B $\alpha$ の構造変化を引き起こし、活性中心であるeIF2B $\epsilon$ を基質であるeIF2結合GDPから遠ざけると言うモデル。

共同研究者の大阪大学田村らによって *B. subtilis* (MtnA) の立体構造が明らかにされた (Tamura et al., 2008) (PDBID:2YVK、2YRF)。これまでに報告されてきた eIF2B $\alpha$ -LP の結晶構造はリガンドを持たないか (*A. fulgidus* PDBID:1T5O)、硫酸イオンを結合していた (*S. cerevisiae* Ypr118wp PDBID:1W2W、*L. major* PDBID:2A0U、*T. maritima* PDBID:1T9K) のに対し、*B. subtilis* (MtnA) では硫酸イオン結合型 (PDBID:2YRF) に加え、新たに生成物 (MTRu-1-P) 結合型の結晶構造 (PDBID:2YVK) が得られた。そこでこれら5種類の生物由来 eIF2B $\alpha$ -LP の結晶構造を比較したところ、タンパク質の二次構造や三次構造は非常に良く似ていたが、リガンドを結合していない *A. fulgidus* (1T5O) のみ、他の構造と異なることが明らかになった (Fig. 2-12)。他の4種の eIF2B $\alpha$ -LP では活性中心と考えられるリガンド結合部位が、外界から遮断されているために、空間充填モデルで表示させると中のリガンドが隠れてしまうのに対し、*A. fulgidus* (1T5O) の推定リガンド結合部位は開いており、他の eIF2B-LP と同様の位置に硫酸イオンを重ね合わせた場合でも、外側から硫酸イオンが観察できた (Fig. 2-12 中段)。

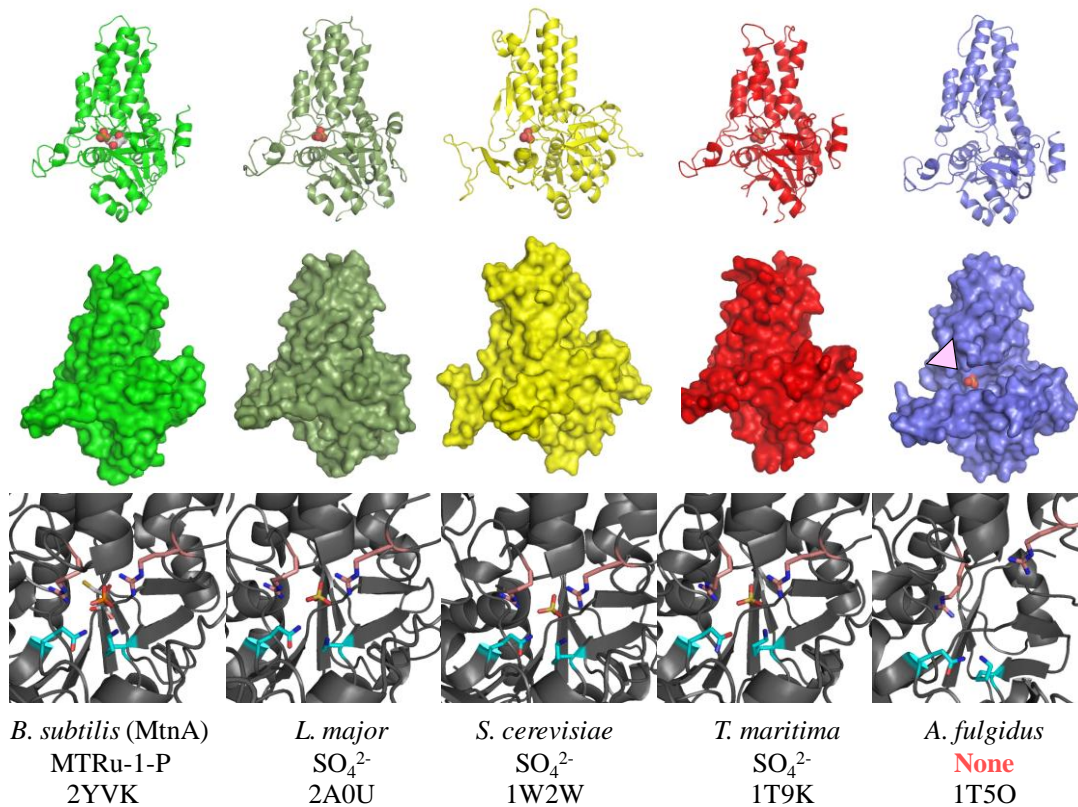


Figure 2-12. eIF2B $\alpha$ -LPの立体構造の比較

eIF2B $\alpha$ -LPの内、結晶構造が解かれている5種を比較した。(上段)それぞれのモノマーをリボンモデルで、リガンドを空間充填モデルで示した。(中段)それぞれのモノマーを充填モデルで示した。*A. fulgidus*でのみ、*S. cerevisiae*のリガンドである硫酸イオン(桃色の矢頭)を重ね合わせて比較した(*A. fulgidus*だけリガンドが無い)。(下段)それぞれの活性部位を拡大表示した。リン酸結合に関わる4アミノ酸残基の内N末の2残基(R51、R94)を朱色で、C末の2残基(Q199、K251)を水色で示した。それぞれのモデルの下に生物種名とリガンド名、PDBIDを示した。

リガンド結合型の4種類のeIF2B $\alpha$ -LPで共通してリン酸、もしくは硫酸イオンの結合に関わっている4残基(R51、R94、Q199、K251)はすべてのeIF2B $\alpha$ -LPに高度に保存されていたが(Fig. 2-2B)、構造的には*A. fulgidus* (1T50)でのみN末の2残基(R51とR94)とC末の2残基(Q199とK251)が離れていた。*B. subtilis* (MtnA)と*A. fulgidus*を重ね合わせて比較すると、*B. subtilis* (MtnA)はリガンドに対してより近い構造をとっていることがわかった(Fig. 2-13)。基質結合型*B. subtilis* (MtnA)では、基質が溶媒から結合部位に至るための十分な大きさの経路が存在しないことから、*B. subtilis* (MtnA)が基質結合時、生成物解離時に構造変化を起こしていることが考えられた。以上のことから、*B.*

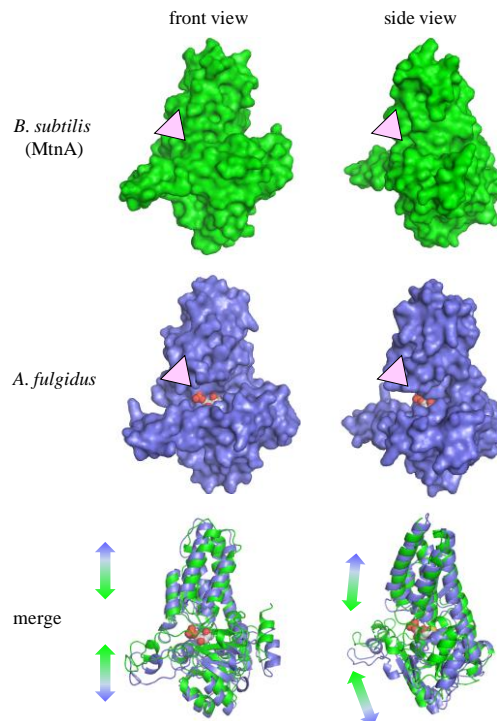


Figure 2-13. *B. subtilis* (MtnA)と*A. fulgidus*の立体構造の比較  
*B. subtilis* (MtnA)では、正面からも側面からもリガンド(MTRu-1-P)を外側から見るができないが(上段)、*A. fulgidus*の場合は両面からリガンドが見れる(中段)(元々の*A. fulgidus*の構造にはリガンドが含まれておらず、MtnAのMTRu-1-Pを重ね合わせた)。両構造を重ね合わせると、相対的にMtnAがリガンドに近い構造をとっていることがわかる(下段)。

*subtilis* (MtnA) は基質 (MTR-1-P) を結合していない状態では *A. fulgidus* のような活性中心を露出するような構造をとっており、基質結合に伴い、特に N 末と C 末にそれぞれ存在するリン酸結合アミノ酸が、リン酸の結合を介して距離を縮めることにより立体構造を変化させ、ちょうど口を閉じるように活性部位を外界から遮断していると予想された (Fig. 2-14)。溶媒からの水素の授受を伴わないヒドリド移動機構は、疏水的な環境で起こりやすいと考えられているために、ヒドリド移動機構である MTR-1-P イソメラーゼが立体構造変化によって、反応中に疏水的環境を作り出すということは非常に合理的である。また、先に挙げたように、eIF2B $\alpha$ においてもリン酸基との結合に伴う立体構造変化によって、翻訳開始を調節しているのだとしたら、eIF2B $\alpha$ と eIF2B $\alpha$ -LP の分子進化を考える上でも大変興味深い。今後、未だ明らかになっていない、MtnA のリガンド非結合型の結晶構造や、eIF2B $\alpha$ の結晶構造が解き明かされれば、両者の構造や機能の比較により、分子進化の過程が見えてくることが期待される。

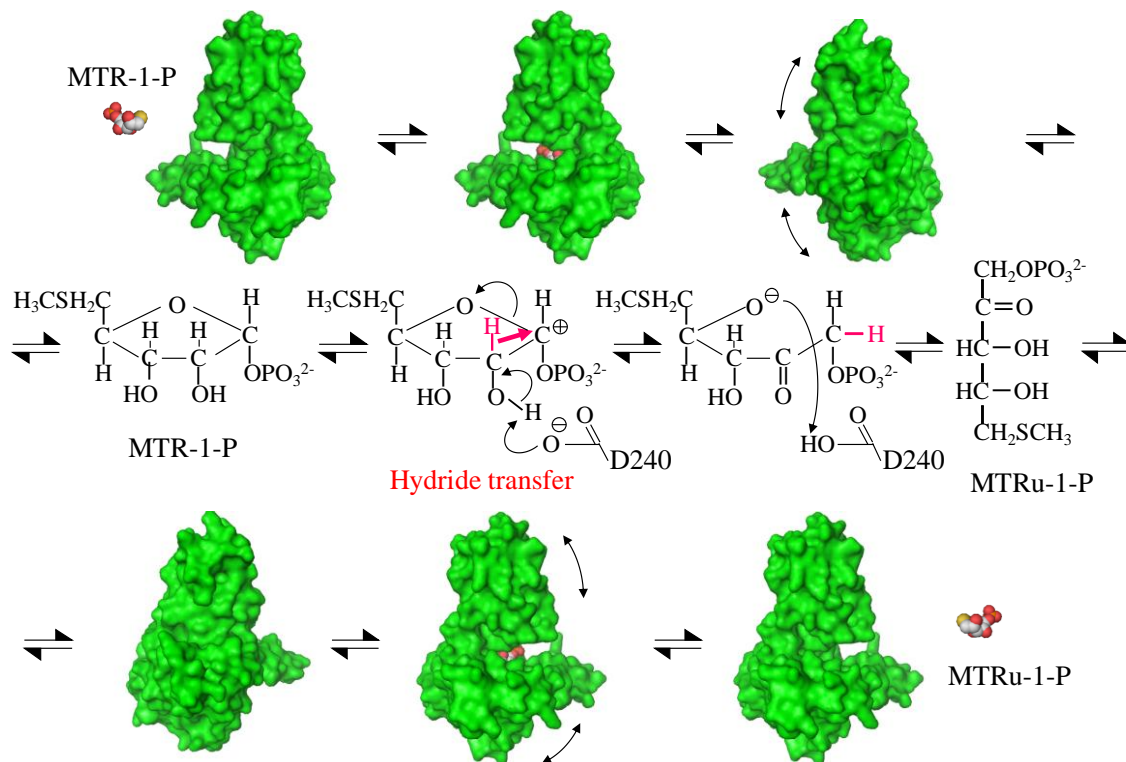


Figure 2-14. 予想されるMTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) の立体構造の変化と反応機構モデル



## 第3章

### メチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼの解析

### 3-1 序論

メチルチオリブローズ 1-リン酸デヒドラターゼ (MtnB) はメチルチオリブローズ 1-リン酸 (MTRu-1-P) から脱水反応を伴って 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸 (DK-MTP-1-P) を生成する反応を触媒する酵素である (Fig. 3-1)。アミノ酸配列の相同性から二価金属を必要とするアルドラーゼ関連ファミリー FucA/RhuA/RibE に属している (Fig. 3-2)。代表的な酵素にはそれぞれフクロース 1-リン酸アルドラーゼ (FucA)、ラムロース 1-リン酸アルドラーゼ (RhuA)、リブローズ 5-リン酸 4-エピメラーゼ (RibE) がある (Dreyer et al., 1993; Johnson and Tanner, 1998; Lee et al., 2000a; Luo et al., 2001; Samuel et al., 2001; Kroemer et al., 2003) (Fig. 3-1)。しかし、これらの 3 酵素はすべて分子量の変化を伴わない異性化酵素であるのに対して、MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) は脱水反応を触媒する。そのため MTR-1-P イソメラーゼ (MtnA) と同様に、我々の機能同定以前にアミノ酸配列の相同性から、本来の機能を予測することができなかった。しかし、*B. subtilis* において *mtnB* と同じオペロン上に存在する *mtnD* の推定アミノ酸配列がメチオニン還元硫黄再生経路で働く 1,2-ジヒドロキシ 3-ケト 5-メチルチオペンテン (DHK-MTPene) ジオキシゲナーゼと相同性が高かったこと、上流に硫黄代謝関連遺伝子の発現制御配列である S-box が存在することから、メチオニン還元硫黄再生経路で働いていると考えられた (Grundy and Henkin, 1998) (Fig. 3-3)。さらに *B. subtilis* の *mtnB* 欠失変異体がメチオニン還元硫黄再生経路の中間代謝産物であるメチルチオアデノシン (MTA) を単一硫黄源に生育できなくなることから同経路で働くことが支持され (Sekowska and Danchin, 2002)、当研究室における MtnB の触媒活性 (MTRu-1-P デヒドラターゼ活性) の同定に至った (Ashida et al., 2003)。

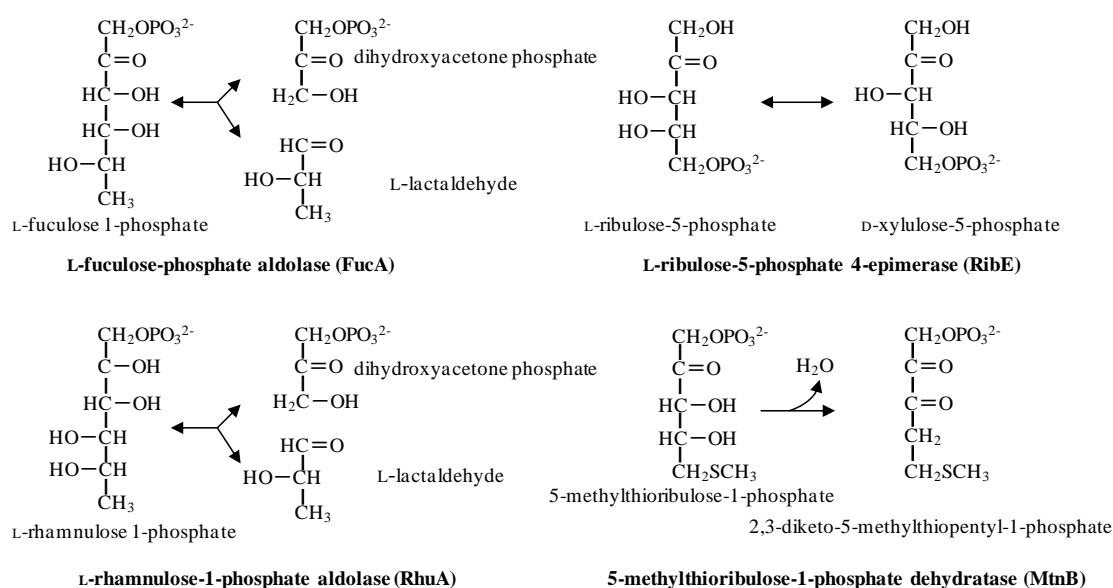
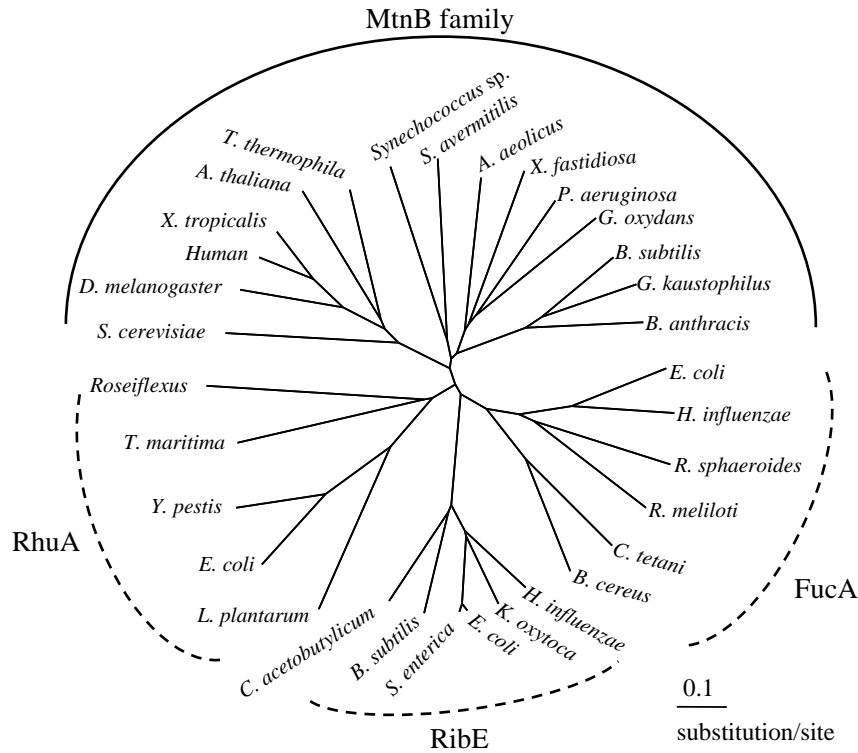
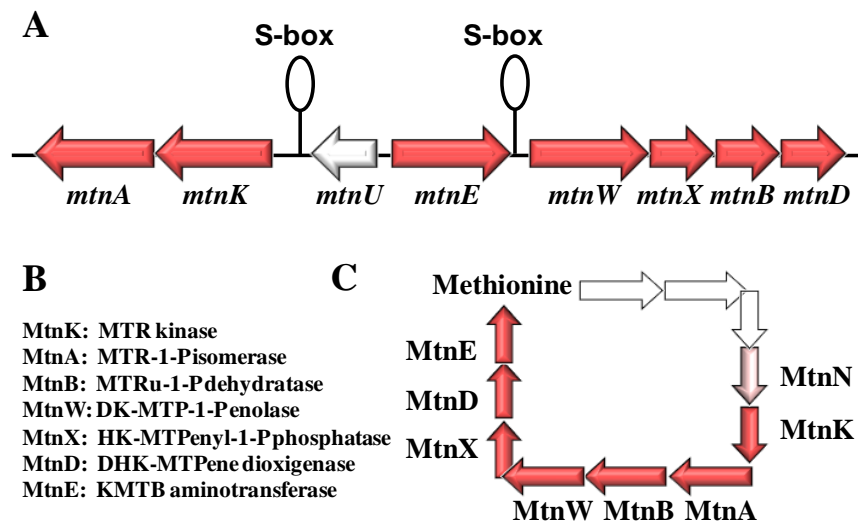


Figure 3-1. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) とFucA/RhuA/RibEとの触媒反応の比較



**Figure 3-2. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) の相同タンパク質とFucA/RhuA/RibEファミリーの分子系統樹**

系統樹を作成するために用いた種名は以下の通りである。 *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *B. anthracis*, *Bacillus anthracis*; *G. kaustophilus*, *Geobacillus kaustophilus*; *G. oxydans*, *Gluconobacter oxydans*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *X. fastidiosa*, *Xylella fastidiosa*; *S. avermitilis*, *Streptomyces avermitilis*; *Synechococcus* sp., *Synechococcus* sp WH8102; *T. thermophila*, *Tetrahymena thermophila*; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*; *X. tropicalis*, *Xenopus tropicalis*; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Roseiflexus*, *Roseiflexus* sp. RS-1; *T. maritima*, *Thermotoga maritima*; *Y. pestis*, *Yersinia pestis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *L. plantarum*, *Lactobacillus plantarum*; *C. acetobutylicum*, *Clostridium acetobutylicum*; *S. enterica*, *Salmonella enterica*; *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae*; *B. cereus*, *Bacillus cereus*; *C. tetani*, *Clostridium tetani*; *R. meliloti*, *Rhizobium meliloti*; *R. sphaeroides*, *Rhodobacter sphaeroides*。但し、*A. thaliana* と *T. thermophila* に関しては、C末にメチオニン還元硫黄再生経路の別な酵素遺伝子が結合していると考えられたため、それぞれその別遺伝子に該当する162アミノ酸残基、190アミノ酸残基は除外した。系統樹作成にはClustalWとTreeViewを用いた。



**Figure 3-3. メチオニン還元硫黄再生経路の酵素遺伝子が形成するオペロン構造**

(A) メチオニン還元硫黄再生経路で働く酵素遺伝子のオペロン構造。 *mtnA* と *mtnK*、 *mtnW* と *mtnX*、 *mtnB*、 *mtnD* はオペロンを構成しており、両オペロンの上流にS-boxと呼ばれる硫黄代謝関連遺伝子の発現制御配列が存在する。メチオニン還元硫黄再生経路で働く遺伝子を赤い矢印で示した。(B) メチオニン還元硫黄再生経路で働く遺伝子名と酵素名。(C) *B. subtilis* におけるメチオニン還元硫黄再生経路。全8つの反応を触媒する酵素遺伝子の内7つが近傍に存在する (A)。

先行する *Klebsiella* の研究によって MTRu-1-P を基質として DK-MTP-1-P を生成するデヒドラターゼの存在が示されていたため (Furfine and Abeles, 1988)、MtnB が MTRu-1-P を基質として、ジケト構造を持つ生成物に変換するかどうかを *o*-フェニレンジアミンを用いて確かめた。*o*-フェニレンジアミンはジケト基と特異的に反応し、320 nm に吸収極大を持つキノキサリン誘導体を生成する (Morita et al., 1981; Visliser et al., 2007)。実験の結果ジケト構造を有する生成物ができることを確かめた (Ashida et al., 2003)。さらに <sup>1</sup>H-NMR によって生成物の同定を試みたが、MTRu-1-P に MtnB を加えて新たに生じてくるピークは数分以内に直ちに減衰し、新たに生じたピークが消失した状態で DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) を加えても、それ以上反応は進まなかった。つまり、MtnB の生成物である DK-MTP-1-P はジケト構造のためか非常に不安定であることがわかった。メチオニン還元硫黄再生経路の代謝全体の効率を考えるためにも、続く DK-MTP-1-P エノラーゼの解析のためにも、MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) による DK-MTP-1-P の生成速度と分解速度の両方を測定することにした。

## 3-2 材料と方法

### 酵素と基質の調整

MTR-1-P イソメラーゼ (MtnA)、MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB)、DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) はそれぞれ、第2章と同様に His-tag のアフィニティーカラムを用いた精製を行った後に、MTRu-1-P デヒドラターゼについては His-tag をトロンビンにより切断した酵素を用いた。基質である MTRu-1-P は MTR-1-P に MTR-1-P イソメラーゼを加えたものを用い、第2章で求めた MTR-1-P/MTRu-1-P の平衡定数から、正確な MTRu-1-P の濃度を算出した。

### ゲルろ過カラムによる分子量の決定

第2章と同様に Superose 6 10/300 GL カラムを用いて分子質量を測定した。

### MTRu-1-P デヒドラターゼの活性測定

デヒドラターゼの活性は2通りの方法で検出した。1つは生成物である DK-MTP-1-P を *o*-フェニレンジアミンと反応させることにより生成されるキノキサリン誘導体の吸光を測定する方法 (Ashida et al., 2003)。もう1つは第2章と同様に、DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) とカップリングさせることにより、エノラーゼの生成物である HK-MTPenyl-1-P の吸光を測定する方法である。それぞれ、320 nm と 280 nm 付近に吸収極大があることが報告されている (Ashida et al., 2003; Carré-Mlouka et al., 2006; Saito et al., 2007)。活性は 50 mM のトリス塩酸バッファー (pH 7.5) に 1 mM の MgCl<sub>2</sub>、18 µg の MtnW を含む測定系に 2 µg の MtnB を加えることで反応を開始させた。反応系の総量は 100 µl で温度は 25 度である。

### DK-MTP-1-P の分解速度の測定

活性測定と同じバッファー中で、過剰量の MtnB 30 µg を MTRu-1-P に加えて DK-MTP-1-P の生成と分解の速度を 270 nm の吸光変化によって測定した。

### 3-3 結果

MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) は *E. coli* の可溶性画分に大量に発現させることができた (Fig. 3-4)。単一バンドにまで精製できたことから、この精製酵素を以後の解析に用いた。アミノ酸配列からの推定分子質量は 23.5 kDa であるが、His-tag を切断した後にトロンビンの切断認識部位の一部 (セリン、グリシン、ヒスチジンの3アミノ酸) が残るために、リコンビナントタンパク質の推定分子質量は 23.8 kDa である。ゲルろ過カラムの解析結果から、ホロ酵素の分子質量は 91.4 kDa であったことから、MtnB はホモ四量体を形成していると考えられた (Fig. 3-5)。

MTRu-1-P デヒドラターゼの活性は pH 7 から pH 9.5 の間で高い活性を保持しており、pH 7.5 で速度は最大となった (Fig. 3-6A)。一方、温度は 40 度で活性が最大になり 55 度では最大速度の 10% 以下まで活性が下がった (Fig. 3-6B)。アレニウスプロットより求めた MTRu-1-P から DK-MTP-1-P を生成する反応に必要な活性化エネルギー  $E_a$  は 64.0 kJ/mol であった (Fig. 3-6B 挿入図)。pH 7.5、25 度の反応条件下では  $V_{max}$  は 42.7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、 $K_m$  は 8.9  $\mu\text{M}$  であった (Fig. 3-6C)。従って  $k_{cat}$  は 16.7/sec、 $k_{cat}/K_m$  は  $1.88 \times 10^6 / \text{M}/\text{sec}$  であることがわかった。

MtnB が属するクラス II のアルドラーゼ関連酵素は二価金属を触媒に必要とすることが知られている (Horecker et al., 1972; Fessner et al., 1996)。そこで、MtnB の活性にも金属が必要かどうかを調べた。金属を含まないバッファー (トリス塩酸バッファー、pH 7.5) で平衡化したゲルろ過カラムに MtnB を供し、バッファー中の金属を取り除いても活性は変わらなかったが、20 mM の

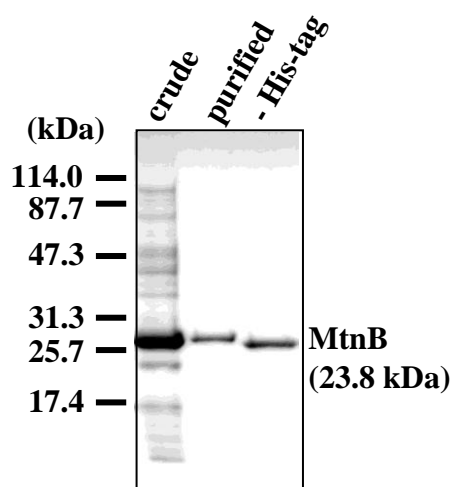


Figure 3-4. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) の精製

各精製段階のMTRu-1-Pデヒドラターゼを用いてSDS-PAGEを行い、CBBにより染色した。粗酵素溶液は10  $\mu\text{g}$ 、精製酵素はそれぞれ2  $\mu\text{g}$ ずつ流している。

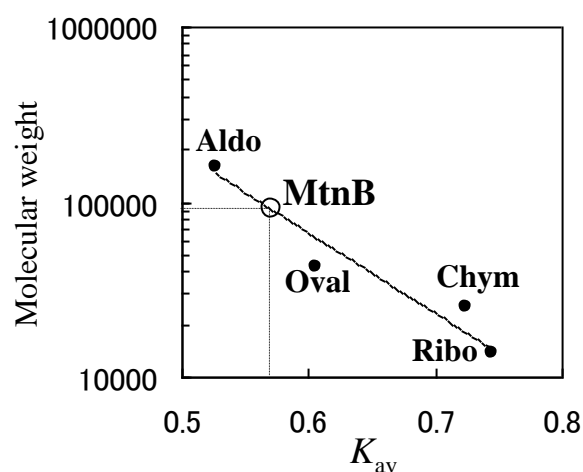
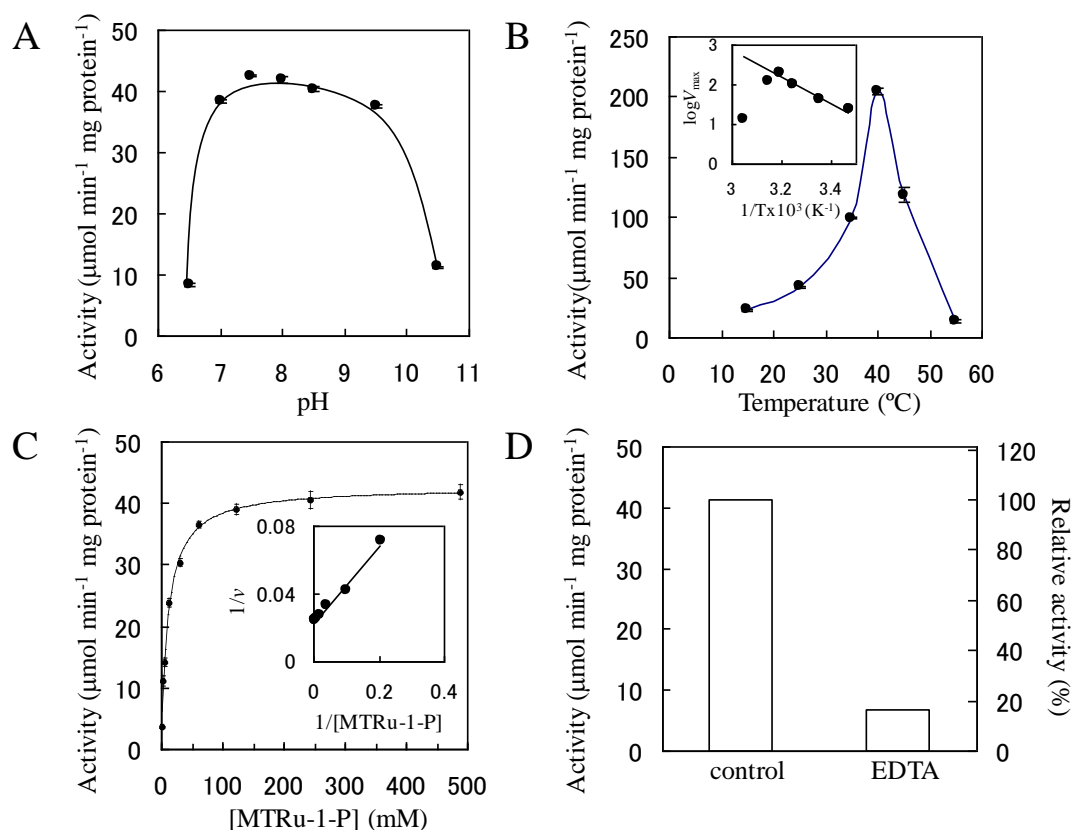


Figure 3-5. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) の分子質量

精製したMTRu-1-Pデヒドラターゼをゲルろ過に供し、分子質量を求めた。標準タンパク質には、アルドラーゼ (158 kDa)、オバルミン (43 kDa)、キモトリプシン (25 kDa)、リボヌクレアーゼA (12.6 kDa) を用いた。分配係数 ( $K_{av}$ ) = (溶出体積 ( $V_o$ ) - 排除体積 ( $V_o$ )) / (ベットの体積 ( $V_o$ ) - 排除体積 ( $V_o$ ))

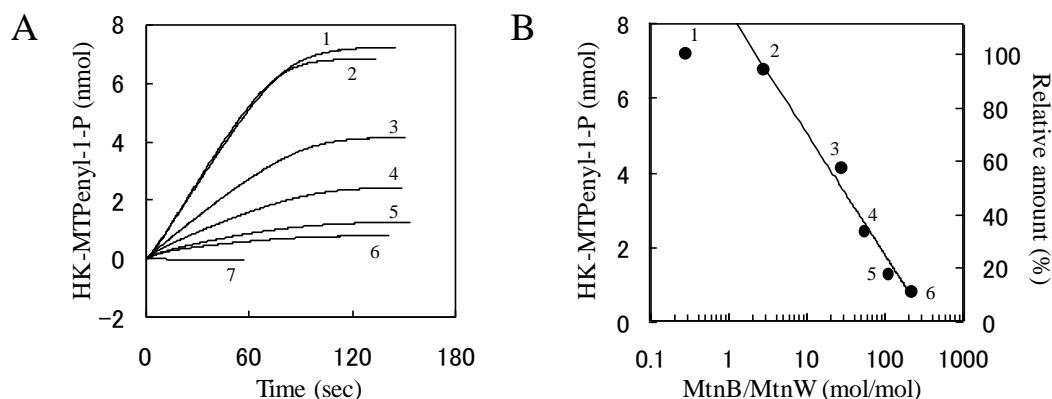


**Figure 3-6. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) の酵素学的諸性質**

精製したMTRu-1-Pデヒドラターゼの (A) 至適pH、 (B) 至適温度、 (C) 最大速度とミカエリス定数を求めた。挿入図はそれぞれ (B) アレニウスプロットと (C) ラインウィーバー・バークプロットを表している。 (D) EDTA処理後の活性を処理前と比較した。

EDTA 共存下で3時間、室温で静置した後、ゲルろ過カラムに供し、金属を含まないバッファーに置換することで EDTA を取り除いて活性を比較したところ、16.5%にまで活性が低下していた (Fig. 3-6D)。

解析をする過程で、MTRu-1-P デヒドラターゼの生成物 DK-MTP-1-P は非常に不安定であることがわかった。実際に等量の MTRu-1-P を含む反応液中で、MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) と DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) を共役させて HK-MTPenyl-1-P の生成量を比較した場合、MtnW に対する MtnB の量比が大きいく程、HK-MTPenyl-1-P の生成量が減少した (Fig. 3-7)。すなわち、MtnB/MtnW (モル比) が大きく、DK-MTP-1-P が MtnW によって消費されるよりも、MtnB によって生成される割合が高い程、HK-MTPenyl-1-P の生成効率が落ちていることがわかった。このことから、DK-MTP-1-P が MtnW によって消費される以外に、不可逆的な自然分解を起こしていることが考えられた。中間代謝産物の分解は代謝系全体の代謝効率に大きな影響を及ぼすことから、次に DK-MTP-1-P の分解速度を求めた。

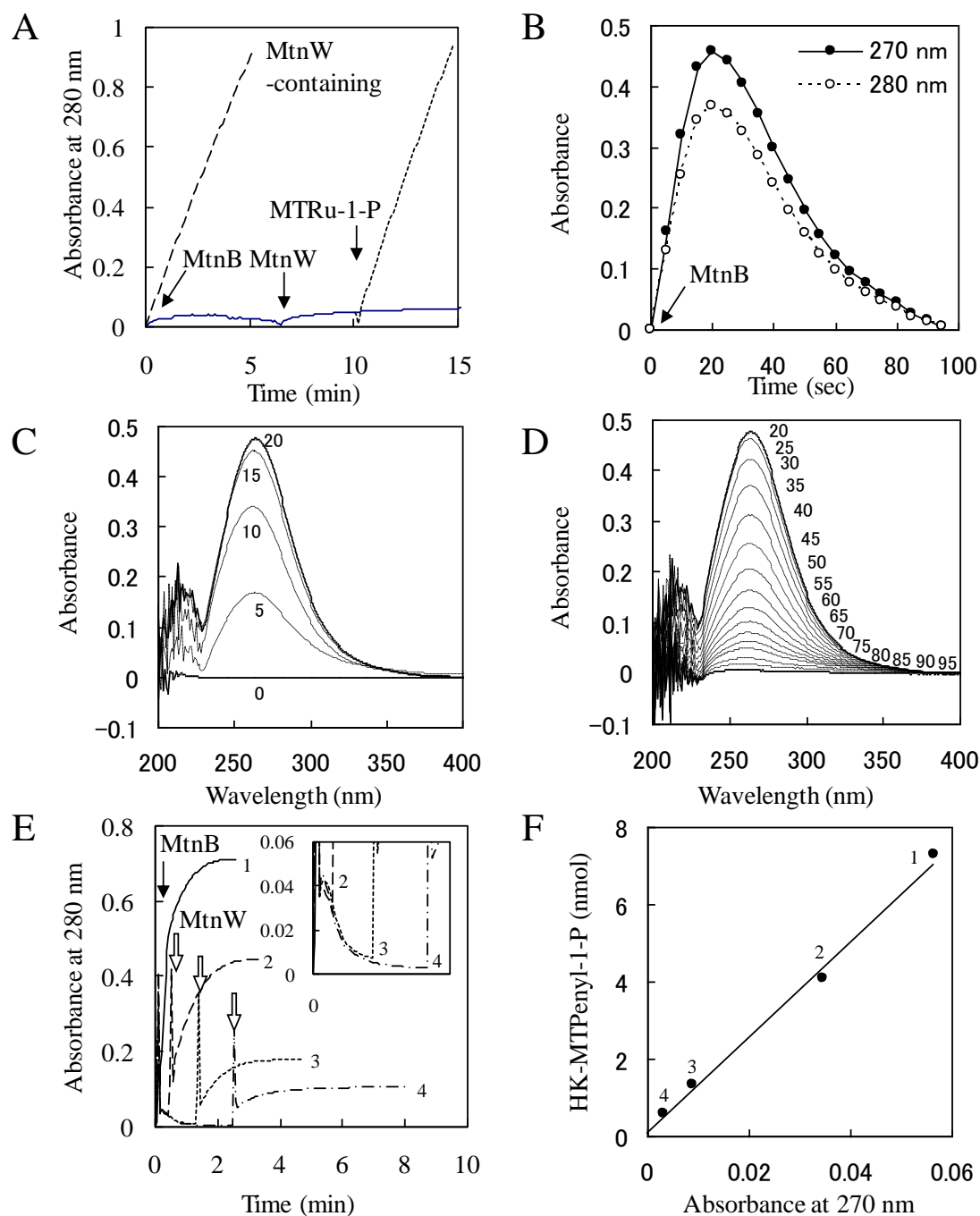


**Figure 3-7. MTRu-1-Pデヒドラーゼ (MtnB) とDK-MTP-1-Pエノラーゼ (MtnW) のモル比とHK-MTPenyl-1-Pの生成量の相関関係**

7.2 nmolのMTRu-1-Pに異なる比のMtnBとMtnWを加えて、280 nmの吸光度からHK-MTPenyl-1-Pの生成量を算出した。(A) 3 μgのMtnBを加えて反応を開始した。MtnWの量は20 μg (1)、2 μg (2)、0.2 μg (3)、0.1 μg (4)、0.05 μg (5)、0.025 μg (6)、2 μg但し基質無し (7)である。(B) 横軸に両酵素のモル比、縦軸にAで求めたHK-MTPenyl-1-Pの生成量をとった。相対量はMtnB3 μg、MtnW20 μgのときの生成量を100%として求めた。

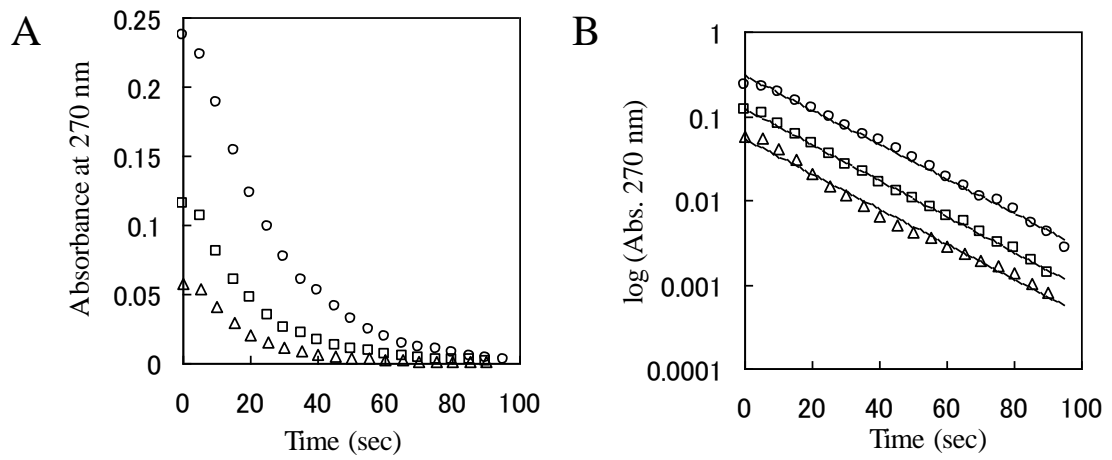
MtnWをあらかじめ添加しておいたMTRu-1-Pを含む反応液にMtnBを加えると、MtnW生成物であるHK-MTPenyl-1-Pが有する280 nmの吸光度の増加を観察することができた (Fig. 3-8A 破線)。しかし、MtnWを添加していないMTRu-1-Pを含む反応液にMtnBを加え、6分間MTRu-1-PとMtnBを反応させた後、MtnWを添加しても280 nmの吸光度増加を観察することができなかった (Fig. 3-8A 実線)。しかし、MtnWを加えた4分後に新たにMTRu-1-Pを加えると280 nmの吸光度が増加し、HK-MTPenyl-1-Pが生成されることがわかった (Fig. 3-8A 点線)。また、高濃度のMTRu-1-Pに多量のMtnBを加えると270 nm付近に吸収極大を持つスペクトルの一過的な増加が確認された (Fig. 3-8B、C、D)。この270 nmの吸光の増加速度は加えるMtnBの濃度と比例関係にあるため、MtnBの触媒反応によって生成されるDK-MTP-1-Pの吸光を表していると考えられた (Fig. 3-8B、C)。さらにこの吸光が速やかに消失してしまうことから、DK-MTP-1-Pが自然に分解され、吸光をもたない別な物質に変換されることが示された (Fig. 3-8B、D)。実際に、MtnBによる反応中の270 nm (280 nm) の吸光度が高い時にMtnWを添加した場合は、270 nm (280 nm) の吸光度が低くなった時にMtnWを添加した場合に比べ、HK-MTPenyl-1-Pの生成量が多く、270 nmの吸光度とHK-MTPenyl-1-Pの生成量との間には比例関係が成りたった (Fig. 3-8E、F)。そこで、MtnBにより生成したDK-MTP-1-Pの分解速度を270 nmの吸光度変化から求めた (Fig. 3-9A、B)。270 nmの吸光度を対数でとった場合に分解過程が直線近似できたことから、この分解反応は一次反応であるとわかり、DK-MTP-1-Pの分解速度定数  $k$  は0.048/sec、分解の半減期  $t_{1/2}$  は14.4秒であることがわかった。





**Figure 3-8. DK-MTP-1-Pの自然分解**

(A) MtnWを反応系に加える時間がHK-MTPenyl-1-Pの生成量に及ぼす影響を280 nmの吸光度変化により調べた。矢印はそれぞれの添加時間を示している。5.5 nmolのMTRu-1-Pに0.8  $\mu$ gのMtnBを加えて測定を開始した。破線は18  $\mu$ gのMtnWを測定前に加えていた反応液、実線はMtnWを含まず、MtnB添加から6分後に18  $\mu$ gのMtnWを加えた反応液、点線は実線の条件でMtnWを添加してから更に4分後（MtnB添加から10分後）に新たに5.5 nmolのMTRu-1-Pを加えた反応液の280 nmの吸光度変化を示した。(B) MtnBの触媒反応における5秒毎の吸光度変化を調べた。MtnWを含まず、75 nmolのMTRu-1-Pを含む反応液に15  $\mu$ gのMtnBを加えて反応を開始し、270 nmと280 nmの吸光度の変化を測定した。MtnB添加後20秒間のスペクトル変化 (C)、20秒から100秒までのスペクトル変化 (D) をそれぞれ図示した。(E) MtnBと反応後異なる時間にMtnWを添加した際の280 nmの吸光度変化。7.2 nmolのMTRu-1-Pに1.3  $\mu$ gのMtnBを添加して測定を開始した。3.1  $\mu$ gのMtnWを測定前に加えていた反応液 (1)、MtnBを添加後25秒後 (2)、添加後78秒後 (3)、添加後150秒後 (4) にそれぞれは3.1  $\mu$ gのMtnWを加えた反応液。黒矢印はMtnBの添加時、白矢印はMtnWの添加時をそれぞれ示している。(F) (E) の実験で生成されたHK-MTPenyl-1-Pの量とMtnWを添加時の270 nmの吸光度の関係。MtnB添加前にMtnWを加えていた反応液については、270 nmの最大値をとった。



**Figure 3-9. DK-MTP-1-Pの分解速度**

異なる濃度のMTRu-1-Pに60  $\mu$ gMtnBを添加し、270 nmの吸光度からDK-MTP-1-Pの分解速度を求めた。MTRu-1-Pの濃度はそれぞれ、0.42 mM (○)、0.2 mM (□)、0.1 mM (△)である。(B)は(A)と同じ結果を用い、縦軸の270 nmの吸光度を対数表示した。

3-4 考察

*B. subtilis* MtnBのアミノ酸配列を用いて相同性検索を行うと、機能未知タンパク質、FucA、RibE、RhuAと相同性を示す。これらのタンパク質のアミノ酸配列を用いて系統樹を作製すると、*B. subtilis* MtnBと他生物の機能未知でMtnBと

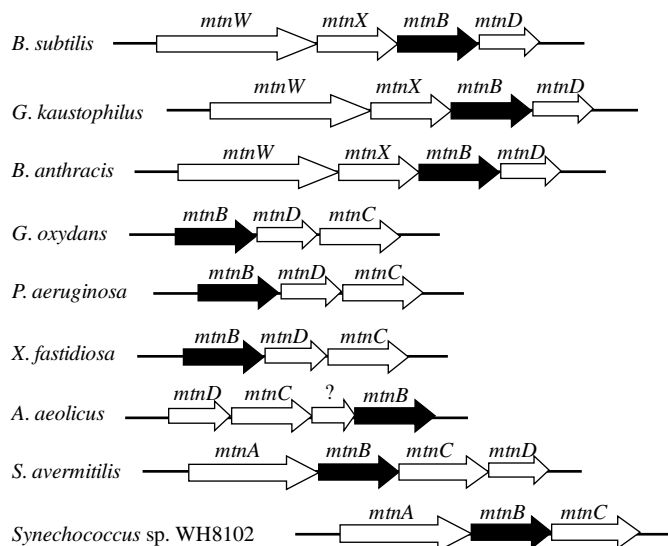


Figure 3-10. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) の相同タンパク質をコードする遺伝子のオペロン構造

*mtnB*遺伝子を黒矢印で、*mtnB*とオペロンを組んでいる遺伝子を白矢印で表している。生物名はFig. 3-2を参照。

相同性を持つタンパク質で形成されるMtnBファミリーのクレードとFucA、RibE、RhuA、計4つのクレードに分かれた (Fig. 3-2)。MtnBファミリーに分類され、*B. subtilis*の近縁種である *Geobacillus kaustophilus*と *Bacillus anthracis*のMtnB相同遺伝子は、*B. subtilis*と同様に *mtnWXBD*オペロンを構成していることから、MTRu-1-Pデヒドラターゼをコードしていると考えられた (Fig. 3-10)。またその他のMtnB相同遺伝子もメチオニン還元硫黄再生経路で機能する遺伝子とオペロンを形成しており、これらのバクテリアにおいてもMTRu-1-Pデヒドラターゼをコードしていると予想された (Fig. 3-10)。

FucA、RibE、RhuAは二価金属依存Class IIアルドラーゼファミリーを構成している

(Dreyer et al., 1993; Johnson and Tanner, 1998; Lee et al., 2000a; Luo et al., 2001; Samuel et al., 2001; Kroemer et al., 2003)。*B. subtilis* MtnBはアミノ酸配列において、*E. coli*のFucAと20.1%、

```

MtnB      --MAAKQERWRELAEVKRELAERDFWFPATSGNLSIKVTDEPLT-----
E. coli FUCA --MERNKLRQI IDTCLEMTLRLGNQGTAGNWS---VRYODG-----
H. influenzae FUCA --MNRAELSQKI IDTCLEMTLRLGNQGTAGNWS---VRYKDG-----
B. subtilis RIBE ---MLETLKKEVLAANLKLQEHQVTFWGNWSG-IDREKER-----
E. coli RIBE   ---MLEDLKRQVLEANLALPKHNLVTLTWGNWSA-VDRERGV-----
E. coli RHUA   MQNITQSWFVQGMIKATTDALWKGWDERNGCNLTLRLLDDADIAPYHDFHQQPRYIPLSQMPPLLANTP
    
```

```

MtnB      FLVTSAG---KDKRKETVEDFLLVDQNGEPAESGHSK---PSAFTLLHTHLYN-KTNAG---
E. coli FUCA MLITPTG---IPYEKLTESHIVFIDGNG---KHEGKL---SSFRFMAAYQSRPDAN---
H. influenzae FUCA MLITPTG---MPYHLMKTEIVVYDNG---KHEENK---SSFTQFHLVSVYHTRPEAN---
B. subtilis RIBE  IVIKPSG---VEYSDLTADDLVVNLGD---EVVEGSLK---SSDIPPTVYLYKAFPNGI---
E. coli RIBE   FVIKPSG---VDYSVMTADDMVVSIETG-EVVEGTRK---SSDIPPTVRLLYQAFPSIG---
E. coli RHUA   FIVTGSAGKFFRNVLQDPAANLGIKRVKSDGAGYHILWGLTNEAVTSLPAPLFLSHCERIKATNGK
    
```

```

MtnB      CCL--H H FVNNVNI SELYGDQK I I TFGQEI I KALGLWEENA E V T V P I I E N P A H I P T L A A L F A E E I S ---
E. coli FUCA AVV--H H AVHCTAVS ILNRSI P A I H Y M V A A A G G N S I P C A P Y A T F G T R E L S E H V A L A ---L
H. influenzae FUCA AVV--H H IHCAGLS ILEKPI P A I H Y M V A V S G T D H I P C V P Y A T F G S H K L A S Y V A T G ---I
B. subtilis RIBE  GIV--H H SQWATSWAQSGRDI P P L G T T H A D Y F D S A I P C T R E M Y D E E I I H D Y E L N T G K V I A E T F Q H H ---N Y
E. coli RIBE   GIV--H H SRHAT I W A Q A G S I P A T G T T H A D Y F Y G T I P C T R K M T D A E I N G E Y E W E T G N V I V E T P E K Q G I D A
E. coli RHUA   D R V I M H H A T N L I A L T Y V L E N D T A V F T R Q L W E G S T E C L V F P D G V G I L P W M V P G T D E I G ---Q A T A Q E M
    
```

```

MtnB      ED SG A V L I R N H I T A W G K T A F E A K R V L E A Y E F L F S Y H L K L K T L E H Q L V K ---
E. coli FUCA K N R K A T L Q H H L I A C E V N L E K A L W L A H E V E V L A Q L Y L T T L A I T D P V P V L S D E E I A V V L E K F K T Y G L R I E E ---
H. influenzae FUCA K E S K A I L L A H H L I T C G E N L D K A L W L A Q E V E V L A S V L K L L S T G L E I P L L S K E Q M Q V L G K F H T Y G L R I E E ---
B. subtilis RIBE  E Q V P G V L V N H E P P F C W G T D A L N A I H N A V L E T V A E M A Y H S I M L N K D V T P I N T V L H E K H F Y R K H G A N A Y Y G S ---
E. coli RIBE   A Q M P G V L V H S H E P P F A W G N A E D A V H N A I V L E V A Y M G I F C R Q L A P Q L P D M Q Q T L L D K H Y L R K H G A K A Y Y G Q ---
E. coli RHUA   Q K H S L V L W P H E V F G S G P T L D E T F G L I D T A H E K S A Q V L V V Y S M G G M K Q T I S R E E L I A L G K R F G V T P L A S A L A L
    
```

Figure 3-11. MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) の相同タンパク質を用いたマルチプルアラインメント

FucA/RhuA/RibEファミリー間で保存されている亜鉛イオン結合に関わるヒスチジン残基を黒く反転表示し (Zn)、リン酸結合に関わるアミノ酸残基を実線で囲った (P)。また、大腸菌のFucAとRhuAで触媒残基を考えられているアミノ酸残基を灰色で反転表示した (C)。その他の残基で4つのファミリー全部で保存されていたアミノ酸を破線で囲った。

*B. subtilis*のRibEと23.4%、*E. coli* RhuAと18.7%の相同性を示す。実際、MtnBとFucA/RibE/RhuAファミリーに属するタンパク質のアミノ酸配列を比較すると、MtnBにおいても二価金属を配位するための3つのヒスチジン残基とFucA/RibE/RhuAファミリーの触媒反応においてプロトンの引き抜きを触媒すると予想されているグルタミン酸またはアスパラギン酸残基、さらに基質のリン酸に配位するための残基を保存していた (Fig. 3-11) (Lee et al., 2000b)。これらのことから、MtnBはFucA/RibE/RhuAファミリーと同様の活性中心を有していると考えられた。さらに、MtnBとFucA/RibE/RhuAファミリーの酵素の4次元構造を比較するとMtnBはホモ四量体 (Fig. 3-5) であり、FucA、RibE、RhuAもホモ四量体で機能していることが報告されている (Johnson and Tanner, 1998; Kroemer et al., 2003; Joerger et al., 2000)。4次元構造の一致はMtnBとFucA/RibE/RhuAファミリーの酵素の触媒反応の進化的関連性を考える上で興味深い。FucA/RibE/RhuAファミリーでは3つのヒスチジン残基により配位された $Zn^{2+}$ イオンが、反応中間体エンジオールの安定化に寄与している。本論文では以前の*Klebsiela*のMTRu-1-P デヒドラターゼ活性に $Mg^{2+}$ が必要であるという報告に基づいて、反応系に $Mg^{2+}$ を添加し活性測定を行った (Furfine and Abeles, 1988)。今回の活性測定に用いた精製MtnBが何の金属結合型になっているかは不明であるが、FucA/RibE/RhuAファミリーは $Zn^{2+}$ イオン共存下で最大活性を示すことから (Hixon et al., 1996)、MtnBも最適な二価金属は $Zn^{2+}$ であるかもしれない。実際、今回の解析からMtnBがEDTA処理により活性が減少したことから、触媒活性に2価金属を要求すると考えられた (Fig. 3-6D)。

これまでに MtnB の反応機構は明らかにされていないが、保存されているFucA/RibE/RhuA ファミリーの活性に必須なアミノ酸残基を、MtnB は同じようにデヒドラターゼ反応に利用しているかもしれない (Fig. 3-12)。MtnB の反応機構モデルは、ジオールデヒドラターゼの反応機構を参考にした (Sandala et al., 2006)。MTRu-1-P の3位のプロトンが引き抜かれ、4位から3位にヒドロキシル基が分子内転移し、脱水により3位にケト基が生じ、DK-MTP-1-Pに変換される。重水中で MTRu-1-P に MtnB と MtnW を反応させた場合に、生成されるHK-MTPenyl-1-P の $^1H$ -NMR スペクトル像から、4位の炭素には重水素が取り込まれていることがわかった (Ashida et al., 2003)。この結果は4位の水素が触媒塩基 (溶媒) から供給される図 3-12 の反応機構モデルを支持する。FucA/RibE/RhuA ファミリーでは、まず4位のヒドロキシル基のプロトンが引き抜かれる点が MtnB の反応機構モデルとは異なる。しかし興味深いことに、RhuAの研究結果から、RhuA の触媒中に生成するエンジオール中間体から、副産物としてジカルボニル化合物が生成することが知られている (Hixon et al., 1996) (Fig. 3-13)。もしかしたら、MtnB はこの RhuA が行う副次反応に特化するような分子

進化を遂げたのかもしれない。今後の MtnB の点変異導入解析や X 線構造解析により、MtnB の触媒機構と FucA/RibE/RhuA ファミリーの触媒機構との関連性が明らかになると期待される。

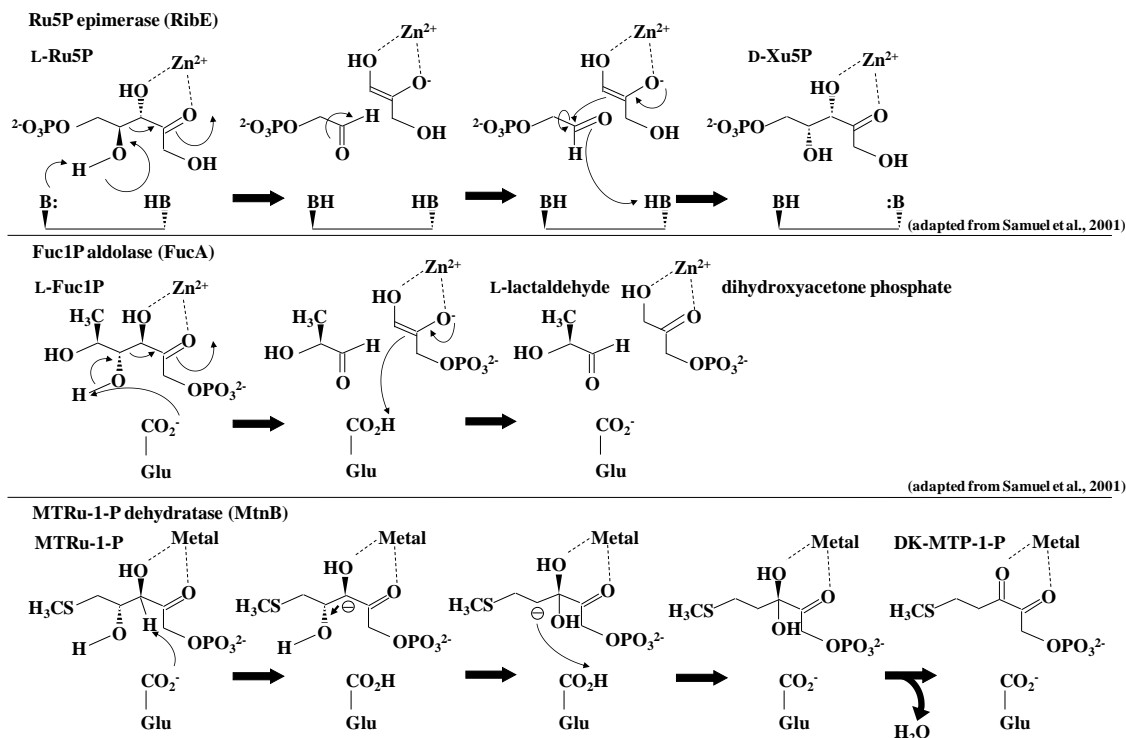


Figure 3-12. RibE と FucA の反応機構と MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) の反応機構の予想モデル

Ru5P エピメラーゼと FucIP アルドラーゼでは共通して、4 位のヒドロキシル基のプロトンが引き抜かれることで反応が開始するが、MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) では、3 位のプロトンが引き抜かれて反応が開始されると考えられた。続いて 4 位から 3 位へのヒドロキシル基の転移が起こり、脱水反応によってケト基が生じ、DK-MTP-1-P が生成される。

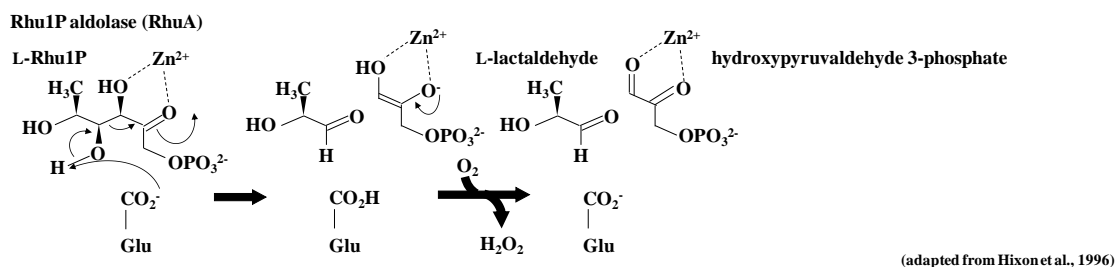
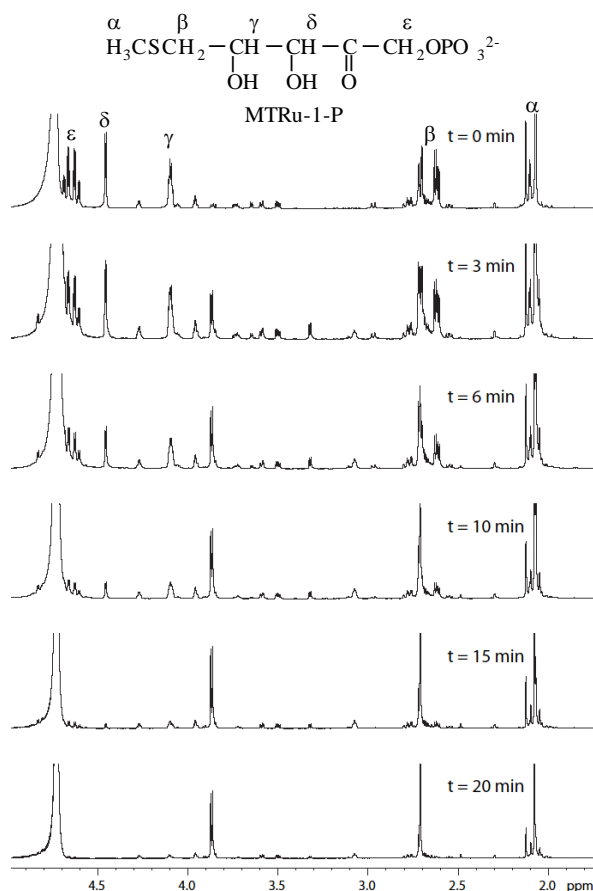


Figure 3-13. RhuA の副次反応

RhuA アルドラーゼの反応中に生成するエンジオール反応中間体に酸素が反応することでジカルボニル化合物が副次的に生成する。

今回の MtnB の酵素学的解析により、MtnB 反応生成物である DK-MTP-1-P が非常に不安定であり、半減期 14.4 秒の速さで自然分解されることが明らかとなった (Fig. 3-9)。自然分解産物の構造を決定するために D<sub>2</sub>O リン酸バッファー (pH 7.5) 中で MTRu-1-P と MtnB を反応させ、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル解析により分解産物の同定を試みた結果、2.1 ppm にメチル基に対応するシングレットピー



**Figure 8-14. MTRu-1-PにMtnB添加後の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル像変化**

重水中でMTRu-1-PにMtnBを加えた後の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル像の時間変化を示した。時間はMtnBを加えた後の経過時間を表す。MTRu-1-Pとアサインできたピーク $\alpha\sim\epsilon$ の内 $\alpha$ 以外はすべて減少する一方で、新たに2.7と3.9 ppm付近にピークが出現したが、両ピークはアサインできなかった。

et al., 2001)。DK-MTP-1-Pの速い分解速度は酵素反応速度にも匹敵することから、DK-MTP-1-Pの分解が反応系に共存しているMtnAやMtnBの触媒によるものかもしれない。今後のDK-MTP-1-Pの分解産物の構造解析や分解の反応機構解析により、DK-MTP-1-Pの分解が反応液中の酸素や金属など他の分子、またはMtnAやMtnBの酵素による原因なのか明らかになると期待される。

DK-MTP-1-Pの自然分解が比較的速いことから、*B. subtilis* 生体内においては次のステップを触媒するMtnWが速やかにDK-MTP-1-Pを捕捉し、メチオニン還元硫黄再生経路の代謝をうまく機能させていると予想された。このため、生体内において、DK-MTP-1-Pをロスなく代謝するために、MtnBとMtnWの存在比が最適に制御されていると考えられる。今回の実験では*in vitro*においてMtnB/MtnW比（モル比）が約1の時に、加えたMTRu-1-Pのほぼ全てが

ク、2.7 ppmと3.9 ppmにアサインすることができなかった、それぞれシングレットとダブルットピークが得られたが、分解産物の構造決定を行うことはできなかった (Fig. 3-14)。しかしながら、これまでに、DK-MTP-1-Pは不安定で、メタンチオール基の脱離反応が起こることが報告されている (Imker et al., 2007)。さらに、DK-MTP-1-Pはジカルボニル基を有しており、このジカルボニル基が不安定性の原因だと予想される。実際、アスコルビン酸からの酸化産物であるジカルボニル基を有する2,3-ジケトグロン酸 (DKG) が自然分解によりトレオソーン (threosone)、トレオン酸、キシロン酸、エリスルロース (erythrulose) などに分解されることが報告されている (Li et al., 2001; Nishikawa et al., 2001)。しかし、DKGのリン酸バッファー (pH 7.5)、37°C下での半減期は数時間であり、DK-MTP-1-Pの半減期はこれよりも数オーダー高い値である (Nishikawa

HK-MTPenyl-1-P に変換されたが、モル比が 10 以上では生成される HK-MTPenyl-1-P の量が減少した (Fig. 3-7)。また、同じタンパク質量であっても MtnW を MtnB の反応直後に加えた場合の方が、反応後しばらくしてから加えた場合に比べて生成される HK-MTPenyl-1-P の量が多かった (Fig. 3-8A, E, F)。これらの結果から、メチオニン還元硫黄再生経路を効率よく回すためには、MtnB と MtnW のモル比がおよそ 1 対 1 で、時間的にも空間的にも両酵素が近接していることが望ましいと考えられた。MtnB が MtnW とオペロンを構成していることはその観点から非常に合理的であることがわかった。他の MtnB 相同遺伝子を持つ生物種に関しても、MtnW もしくは、同じく DK-MTP-1-P を基質とする DK-MTP-1-P ホスホリラーゼ (MtnC) とオペロンを形成していることも、両者が共発現することの重要性を示していると考えられた (Fig. 3-10)。

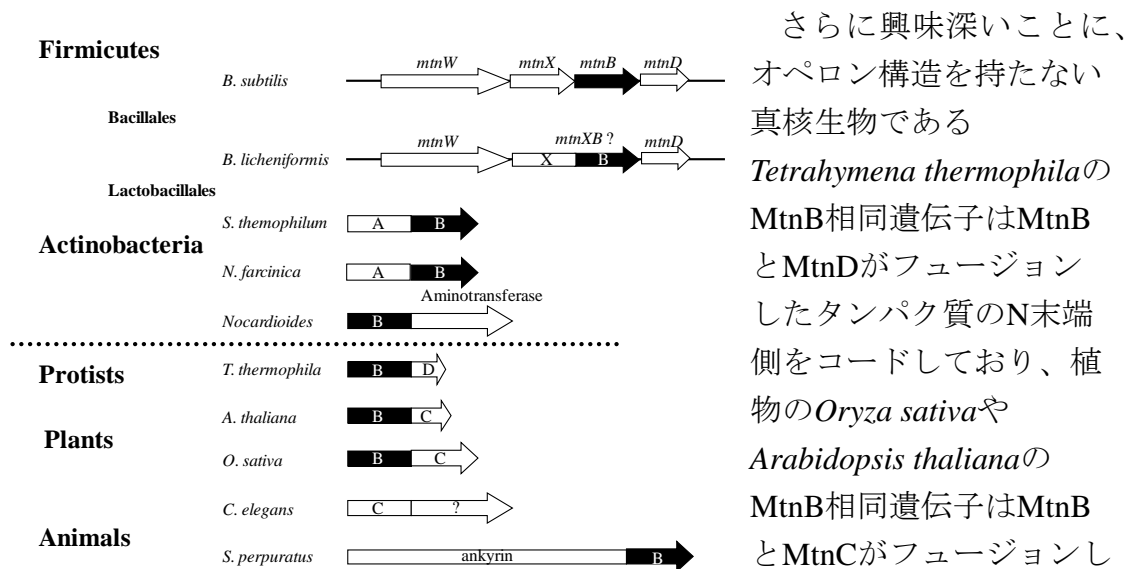


Figure 3-15. MTRu-1-P デヒドラターゼ (MtnB) と相同領域を持つキメラ遺伝子。

各遺伝子を矢印で、MtnB と相同性を持つ領域を黒塗り以示した。生物名は Fig. 3-2 を参照。

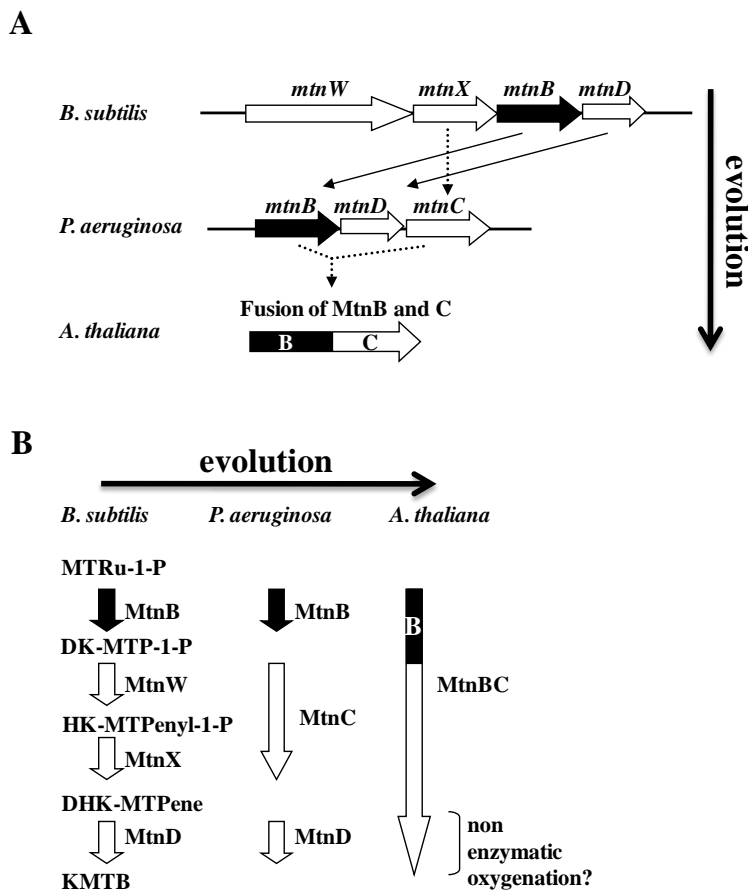
さらに興味深いことに、オペロン構造を持たない真核生物である

*Tetrahymena thermophila* の MtnB 相同遺伝子は MtnB と MtnD がフュージョンしたタンパク質の N 末端側をコードしており、植物の *Oryza sativa* や *Arabidopsis thaliana* の MtnB 相同遺伝子は MtnB と MtnC がフュージョンしたタンパク質をコードしていた (Fig. 3-15)。この事実は、これらの真核生物においても、MtnB 相同

遺伝子が MTRu-1-P デヒドラターゼとして機能していることを示唆している

(Sekowska et al., 2004)。バクテリアにおいて 1 つのタンパク質として存在する MtnB が真核生物においてメチオニン還元硫黄再生経路で機能する他の酵素とフュージョンしていることは、酵素学的、分子進化的に非常に興味深い。MtnC は HK-MTPenyl-1-P ホスファターゼ (MtnX) とアミノ酸配列に相同性があり、同じ 2-ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属する酵素である (Wang et al., 2005)。DHK-MTPene から KMTB が生成されるジオキシゲナーゼの反応は、自動酸化によっても進むことが知られている (Berger et al., 2003)。植物の *O. sativa* や *A. thaliana* で発見されたようなフュージョン酵素の存在と合わせて分子進化の

過程を考えると、この代謝系はより酵素を少なくすることで、代謝効率を上げるような進化を遂げてきたのかもしれない (Fig. 3-16)。つまり、まず、HK-MTPenyl-1-Pホスファターゼ (MtnX) がDK-MTP-1-Pエノラーゼ/ホスファターゼ (MtnC) となり、DK-MTP-1-Pエノラーゼ (MtnW) 活性を獲得し、不要になったMtnWは第四章で述べるようにRuBPカルボキシラーゼ活性を獲得し、RuBisCOとなる。さらにMTRu1-Pデヒドラターゼ (MtnB) とDK-MTP-1-Pエノラーゼ/ホスファターゼ (MtnC) が結合し、1つの酵素でデヒドラターゼ/エノラーゼ/ホスファターゼの3段階を触媒する。HK-MTPenyl-1-Pホスファターゼの生成物DHK-MTPeneはDHK-MTPeneオキシゲナーゼ (MtnD) を介さなくても自動酸化することで代謝系がまわることが知られているので、MtnBCのキメラ酵素だけで4段階の反応を進めることができると予想された (Fig. 3-16)。



**Figure 3-16. メチオニン還元硫黄再生経路酵素群の進化モデル**

(A) メチオニン還元硫黄再生経路を構成する代謝酵素のオペロン構造の変遷モデル (Fig. 3-10、15より一部抜粋し改変)。

(B) Aの生物におけるメチオニン還元硫黄代謝系で働く酵素の比較。B. subtilisが4酵素で行っていた反応を植物では1酵素で進行させているのかもしれない。生物名はFig. 3-2を参照。



## 第4章

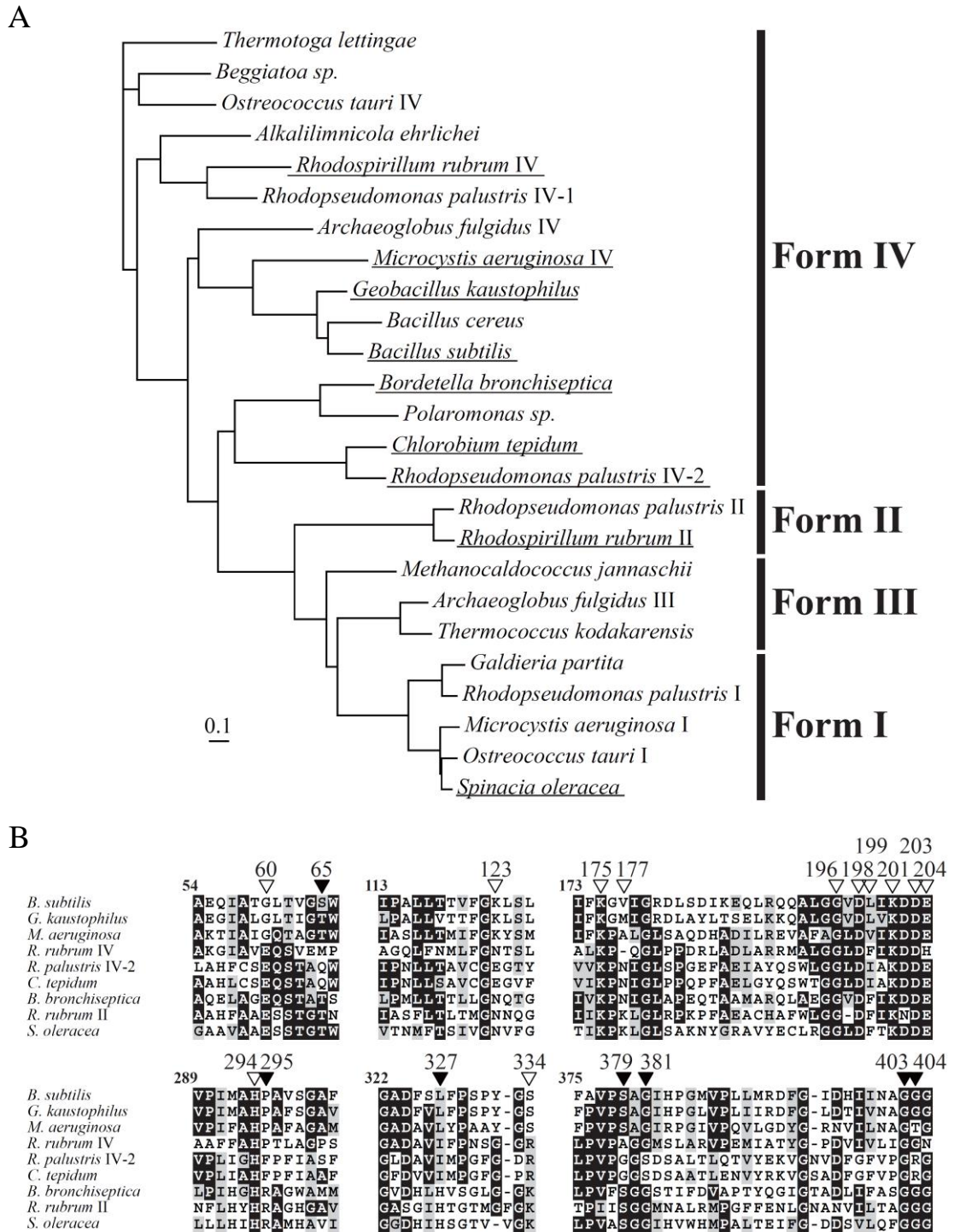
### 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼの解析

#### 4-1 序論

*B. subtilis* の 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼ (MtnW) は光合成における CO<sub>2</sub> 固定酵素リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) とアミノ酸配列において約 20%の相同性を持つことから RuBisCO 様タンパク質 (RLP) と呼称されている (Hanson and Tabita, 2001; Ashida et al., 2003)。RuBisCO は光合成のカルビン・ベンソン・バッシュャム回路において、大気 CO<sub>2</sub> を有機物に固定する酵素である (Miziorko and Lorimer, 1983; Andrews and Lorimer, 1987; Hartman and Harpel, 1994; Portis and Parry, 2007)。RuBisCO はその触媒効率の悪さや、オキシゲナーゼ反応によるカルボキシラーゼ反応の拮抗阻害などから光合成の律速段階と考えられている (Hudson, et al., 1992; von Caemmerer et al., 1997)。植物はこの RuBisCO の性能の悪さを補うために、多量の窒素源を投資して葉に RuBisCO を蓄積させる (Feller, et al., 2007)。

RuBisCOの配列や性質は非常に多様性があり、同酵素同士のアミノ酸配列であっても30%以下の相同性しか示さないものもある (Finn et al., 2003; Selesi et al., 2005; van der Wielen, 2006)。オキシゲナーゼ反応に対するカルボキシラーゼ反応の割合を表す比特異係数も、0.5から238と幅が広い (Uemura et al., 1997; Watson and Tabita, 1999)。基質であるCO<sub>2</sub>に対する親和性も約100倍異なる場合がある (Tcherkez et al., 2006)。そこで配列と機能を比較することで、より機能が高い RuBisCOを得ようと様々な試みがなされてきた (Parry et al., 2003; Smith and Tabita, 2003; Mueller-Cajar et al., 2007)。

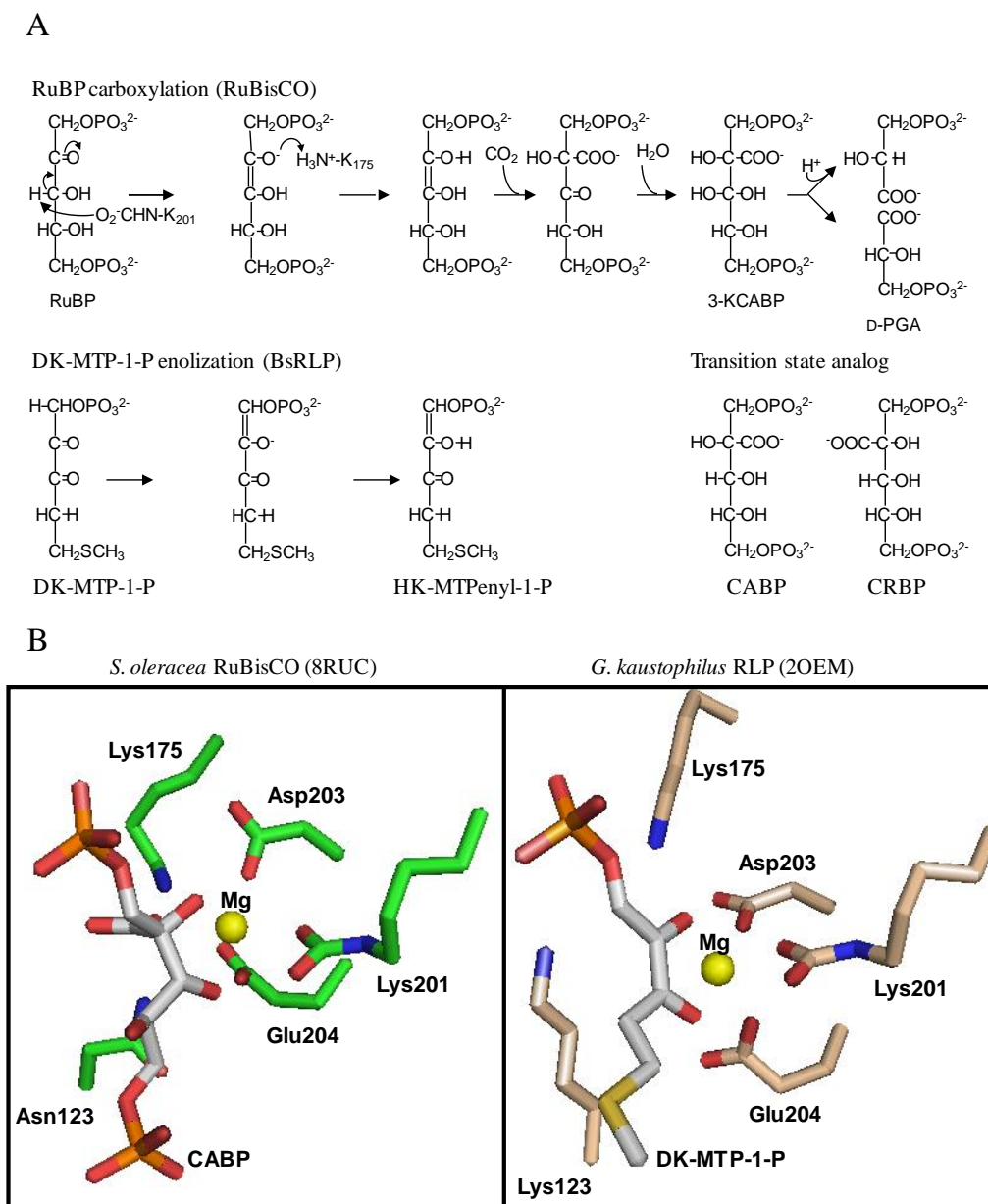
CO<sub>2</sub> 固定能を有さない RLP の発見は、RuBisCO 研究に新たなアプローチをもたらした (Hanson and Tabita, 2001; Ashida et al., 2003)。RuBisCO と RLP の分子系統樹は大きく 4つのクレードに分かれる (Fig. 4-1A) (Hanson and Tabita, 2001; Ashida et al., 2003)。フォーム I と II に含まれる RuBisCO は光合成もしくは化学合成において CO<sub>2</sub> を固定している RuBisCO である。フォーム III は古細菌が持つ RuBisCO で、カルボキシラーゼ活性を持つが、生体内での機能は未だわかっていない (Finn et al., 2003; Sato et al., 2007)。これらフォーム I から III の RuBisCO は 19 の活性必須残基のほぼ全てを共通に保存している (Fig. 4-1B)。フォーム IV を構成する RLP はフォーム I や II の RuBisCO と相同性が 20%程度しかないが、活性必須 19 残基の内、8 から 18 アミノ酸残基が RuBisCO と共通して保存されている (Ashida et al., 2003; Imker et al., 2007; Tabita et al., 2007)。 *B. subtilis* の RLP (MtnW) は 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸のエノラーゼ反応を触媒するが、RuBisCO の基質である RuBP のカルボキシラーゼ反応は触媒しない (Fig. 4-2A) (Ashida et al., 2003, 2005)。 *B. subtilis* の RLP (MtnW) がカルボキシラーゼ活性を示さないのはおそらく、RuBisCO のカルボキシラーゼ活性に必要な 19 残基の内 8 つが別のアミノ酸残基に変わっているためだと考えられた



**Figure 4-1. DK-MTP-1-P-ε (MtnW) の相同タンパク質とRuBisCOとの相同性**

(A) 推定アミノ酸配列をもとに描いた分子系統樹。系統樹を作成するために用いた遺伝子は以下の通りである。*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 RLP (NP\_389242) *Thermotoga lettingae* TMO (YP\_001471302), *Beggiatoa* sp. SS (ZP\_01997270), *Ostreococcus tauri* (*Ostreococcus tauri* IV, CAL54998), *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 (YP\_742007), *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 (*Rhodospirillum rubrum* IV, YP\_427085), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (*Rhodopseudomonas palustris* IV-1, NP\_947514), *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304 (*Archaeoglobus fulgidus* IV, NP\_070416), *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (*Microcystis aeruginosa* IV, CAJ43366), *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (YP\_146806), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (NP\_833754), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NP\_887583), *Polaromonas* sp. JS666 (YP\_546958), *Chlorobium tepidum* TLS (NP\_662651), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (*Rhodopseudomonas palustris* IV-2, NP\_945615), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (*Rhodopseudomonas palustris* II, NP\_949975), *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 (*Rhodospirillum rubrum* II, YP\_YP\_427487), *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (NP\_248230), *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304 (*Archaeoglobus fulgidus* III, NP\_070466), *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (YP\_184703), *Galdieria partita* (BAA75796), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (*Rhodopseudomonas palustris* I, NP\_946905), *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (*Microcystis aeruginosa* I, CAJ43363), *Ostreococcus tauri* (*Ostreococcus tauri* IV, YP\_717262) *Spinacia oleracea* (NP\_054944). ClustalWを用いて配列解析を行い、TreeViewで作図した。(B) (A)で下線を引いた遺伝子のマルチプルアラインメント。同一残基は黒で、類似残基は灰色で反転してある。RuBisCOに必須な19アミノ酸残基の内、RuBPの結合な残基を黒三角で、触媒残基と考えられるアミノ酸残基を白三角で示した。配列番号は*S. oleracea*のRuBisCOの配列番号を用いた。

(Fig. 4-1B)。異なる 8 残基は N 末端側に多かった。一方、*Rhodospirillum rubrum* の RuBisCO はわずかではあるが、DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を有していた (Ashida et al., 2003)。これらの結果と基質の化学構造の類似性から、DK-MTP-1-P エノラーゼと RuBisCO は進化的繋がりが強いと考えられた (Fig. 4-2A) (Ashida et al., 2003, 2005; Imker et al., 2007)。



**Figure 4-2. DK-MTP-1-Pエノラーゼ (MtnW) とRuBisCOにおける触媒反応と立体構造の相同性**  
 (A) DK-MTP-1-PエノラーゼとRuBisCOの触媒反応の比較。(B) DK-MTP-1-PエノラーゼとRuBisCOの活性部位の立体構造の比較。左が*S. oleracea* のRuBisCOのCABP結合型 (8RUC) で右側が*G. kaustophilus*のRLP (2OEM)。アミノ酸残基の側鎖とリガンドはスティックで表示した。リガンドの炭素鎖は白、リン酸基は赤と橙色で表した。Mg<sup>2+</sup>は黄色である。

RuBisCO の触媒反応はカルバメート化した 201 番目のリジン残基（アミノ酸の番号はハウレンソウの RuBisCO に準拠した）が触媒塩基となり、RuBP の C3 から水素を引き抜くことによって、RuBP のシスエンジオールを生成する反応から始まる (Fig. 4-2A) (Cleland et al., 1998)。生成された RuBP のシスエンジオールは Lys175 と His294 で安定化される (Taylor and Andersson, 1997)。Asn123 と Lys201、Asp203、Glu204 は  $Mg^{2+}$  イオンを介して、RuBP のシスエンジオールを安定化する (Cleland et al., 1998)。一方、*B. subtilis* の RLP (MtnW) は DK-MTP-1-P の C1 のプロトンを引き抜くことで反応を開始する (Ashida et al., 2005; Imker et al., 2007; Tabita et al., 2007)。*B. subtilis* の RLP (MtnW) とアミノ酸配列において 60% の相同性を示す *Geobacillus kaustophilus* の DK-MTP-1-P エノラーゼ (RLP) の立体構造上、DK-MTP-1-P のアナログ 2,3-ジケトヘキサシアン 1-リン酸 (DK-H-1-P) の C1 に Lys123 の  $\epsilon$ -アミノ基が最も近かったことから、DK-MTP-1-P エノラーゼにおける触媒塩基として Lys123 が考えられた (Imker et al., 2007)。RuBisCO において触媒塩基として働くカルバメート化した Lys201 は、*G. kaustophilus* の RLP においても RuBisCO と同様に Asp203 や Glu204 と協調して  $Mg^{2+}$  イオンを結合させているにも関わらず、201 番目のリジンをアラニンに変えても活性は変わらなかったことから触媒塩基では無いと報告されている (Imker et al., 2007)。つまり、DK-MTP-1-P エノラーゼ (RLP) は構造や機能面で RuBisCO と非常に良く似ていることがわかったが、反応を開始させるのに必要な触媒残基の種類は異なっていると予想された。

そこで RLP と RuBisCO の構造的、機能的関連性をより詳しく調べるために、まず、DK-MTP-1-P エノラーゼの酵素学的特徴づけを行い、次に、*B. subtilis* の RLP (MtnW) に対する阻害実験と変異実験を行い、先行する RuBisCO の実験結果と比較した。また、*B. subtilis* 以外の RLP で DK-MTP-1-P エノラーゼ活性の有無を調べた。本研究から、DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を持つ RLP はある分子系統樹上のあるクレードに限られ、RuBisCO と同じように 123 番目、175 番目、201 番目、203 番目、204 番目のアミノ酸残基は DK-MTP-1-P のエノラーゼ活性に必須であることがわかった。さらに驚くべきことに、*B. subtilis* の RLP は、RuBisCO の RuBP カルボキシラーゼ反応の遷移状態アナログ 2-カルボキシアラビニトール 1,5-ビスリン酸 (CABP、Fig.4-2A) を立体特異的に結合することがわかった。これらの結果は、RLP と RuBisCO が構造的、機能的に非常に相関性が高いということを明らかにした。

## 4-2 材料と方法

### 試薬の合成

キシロース 1,5-ビスリン酸 (XuBP) は Yokota (1991) の方法に従い、ジヒドロキシアセトンリン酸とグリコールアルデヒドリン酸のアルドール縮合により合成した。得られた産物を SuperQ-TOYOPERL (TOSOH) に供し、LiCl の濃度勾配により精製し、XuBP の画分を回収した。XuBP の濃度は、ウサギ筋肉アルドラーゼと  $\alpha$ -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼを用いたカップリング系により、消費された NADH 量から算出した。

2-カルボキシアラビニトール 1,5-ビスリン酸 (CABP) と 2-カルボキシリビトール 1,5-ビスリン酸 (CRBP) は Pierce ら (1980) の方法に従って合成した。両光学異性体の混合物を MonoQ 5/50 カラム (GE Healthcare, Japan) にアプライし、LiCl の濃度勾配により、CABP と CRBP に分離した。溶出画分を分取後、紫外領域に吸収があった画分のリン酸量を Ames (1966) の方法を用いて定量した。リン酸のピーク毎にまとめて Na<sup>+</sup>フォームの Dowex50 カラム (Muromachi Kagaku, Japan) に供し、Li<sup>+</sup>から Na<sup>+</sup>への塩の交換を行った。その他の試薬は購入した。

### RLP 遺伝子の取得

*R. rubrum* (NRBC No. 3986) は製品評価技術基盤機構 (NITE) から購入した。購入した菌を 702 培地 (10 g/L のポリペプトン、2 g/L のイーストエキストラクト、1 g/L の MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を含み pH 7.0 に調整) を用いて 30 度で生育させた後に集菌し、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA に対して *Nde*I、*Bam*HI 制限酵素サイト (下線部) をそれぞれ付加したプライマー CATCATATGACGGACAGACTGCG、ACCGGATCCCCTTGCGACCTTGAC を用いて目的 RLP 遺伝子を増幅した。以下、*R. rubrum* の RuBisCO と区別するために *R. rubrum* の RLP を *R. rubrum* IV と表記する。

*Chlorobium tepidum* のゲノム DNA は大阪大学の岡先生より分譲していただいた。*R. rubrum* と同様にゲノム DNA に対して *Nde*I、*Bam*HI 制限酵素サイトをそれぞれ付加したプライマー GACCGGATCAACATATGAATGCTGAAGACG、GCAGCGGATCCCTTTCAGTCCTGCTTC を用いて目的 RLP 遺伝子を増幅した。

*Microcystis aeruginosa* PCC 7806 RLP 遺伝子は共同研究者のパスツール研究所の Tandeau de Marsac 博士に分与していただいた (Carré-Mlouka, et al., 2006)。RLP 遺伝子に対して *Nde*I、*Bam*HI 制限酵素サイトをそれぞれ付加したプライマー

CAGGGTGCTCATATGACTATAATTG、GCAAATTGGCGGGATCCAAAGACTCAC  
を用いて目的 RLP 遺伝子を増幅した。

*Rhodopseudomonas palustris* CGA009 rlp2 と *Bordetella bronchiseptica* RB50 の RLP 遺伝子の N 末端側と C 末端側にそれぞれ *Nde*I と *Bam*HI 制限酵素サイトを付加し、大腸菌のコドン使用頻度に合わせて人工合成した DNA を GeneScript (NJ, U.S.A.) から購入した。以下、合成した *R. palustris* の RLP を *R. palustris* IV-2 と表記する。

### 部位特異的変異の導入

*B. subtilis* の RLP に QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Paris) を用いて以下のプライマーで K123N、K123I、K123E、K175I、K175E、K201I、K201E の各変異を導入した。

```
K123Nfow GCTGACAACAGTGTGTTGGCAATCTGTCCCTGGACGGAAAAATC
K123Nrev GATTTTTCCGTCCAGGGACAGATTGCCAAACACTGTTGTCAGC
K123Ifow GCTGACAACAGTGTGTTGGCATACTGTCCCTGGACGGAAAAATC
K123Irev GATTTTTCCGTCCAGGGACAGTATGCCAAACACTGTTGTCAGC
K123Efow GCTGACAACAGTGTGTTGGCGAGCTGTCCCTGGACGGAAAAATC
K123Erev GATTTTTCCGTCCAGGGACAGCTCGCCAAACACTGTTGTCAGC
K175Ifow GCTGTTAATGAGCATATTTATAGGCGTAATCGGAAGGGACC
K175Irev GGTCCCTTCCGATTACGCCTATAAATATGCTCATTAACAGC
K175Efow GCTGTTAATGAGCATATTTGAAGGCGTAATCGGAAGGGACC
K175Erev GGTCCCTTCCGATTACGCCTTCAAATATGCTCATTAACAGC
K201Ifow GGCGGAGTTGACTTGATTATAGACGATGAAATTTTCTTTGAG
K201Irev CTCAAAGAAAATTTTCATCGTCTATAATCAAGTCAACTCCGCC
K201Efow GGCGGAGTTGACTTGATTGAAGACGATGAAATTTTCTTTGAG
K201Erev CTCAAAGAAAATTTTCATCGTCTTCAATCAAGTCAACTCCGCC
```

PCR 条件は 95 度 1 分で変性させた後に、95 度 50 秒、60 度を 50 秒、68 度を 14 分のサイクルを 18 回繰り返した。さらに、以下のプライマーを用いて他の変異 (K123A、K175A、K201A、D203E、D203N、E304D、E204Q) を導入した。

```
K123Afow CAACAGTGTGTTGGCGCGCTGTCCCTGG
K123Arev TCAGCAAAGCCGGAATATCCTGAG
K175Afow CATATTTGCAGGCGTAATCGGAAGGGACC
K175Arev CTCATTAACAGCGGTCTCTCAAATC
K201Afow GATTGCAGACGATGAAATTTTCT
K201Arev AAGTCAACTCCGCCAAGCGCCTGCT
D203Efow GACGAAGAAATTTTCTTTGAGACTGGTC
D203Nfow GACAATGAAATTTTCTTTGAGACTGGTC
E204Dfow GACGATGATATTTTCTTTGAGACTGGTC
E204Qfow GACGATCAAATTTTCTTTGAGACTGGTC
203&4rev TTTAATCAAGTCAACTCCGCCAAGCG
```

PCR は 94 度を 30 秒、50 度を 30 秒、74 度を 60 秒のサイクルを 30 回繰り返した。

### リコンビナント RLP の発現と精製

第2章と同じ手法により、pET15b の *Nde*I と *Bam*HI 部位へ各 RLP 遺伝子を挿入し、*E. coli* BL21 において各リコンビナント RLP を発現させ、His-bind レジンを用いて RLP タンパク質を精製した。

### ゲルろ過カラムによる分子量の決定

第2章と同様に Superose 6 10/300 GL カラムを用いて分子質量を測定した。

### DK-MTP-1-P エノラーゼの活性測定

第3章と同様に、MTR-1-P と MtnA から MTRMTRu-1-P を合成し、そこに 0.9  $\mu$ g の MtnW を含む、終濃度がそれぞれ 50 mM のトリス塩酸バッファー (pH 8.2)、1 mM の  $MgCl_2$ 、2 mM の MTRu-1-P になるように調整した反応液に 1.3  $\mu$ g の MtnB を加えて測定を開始した (Ashida et al., 2003; Carré-Mlouka, et al., 2006; Saito et al., 2007)。総量は 100  $\mu$ l、35 度で測定を行った。280 nm の吸光度から生成してきた HK-MTPenyl-1-P の量を求めた。反応系中の DK-MTP-1-P の濃度は既知濃度の *o*-フェニレンジアミンとの発色をスタンダードとして用いることにより定量した (Morita et al., 1981; Visliser et al., 2007)。



### 4-3 結果

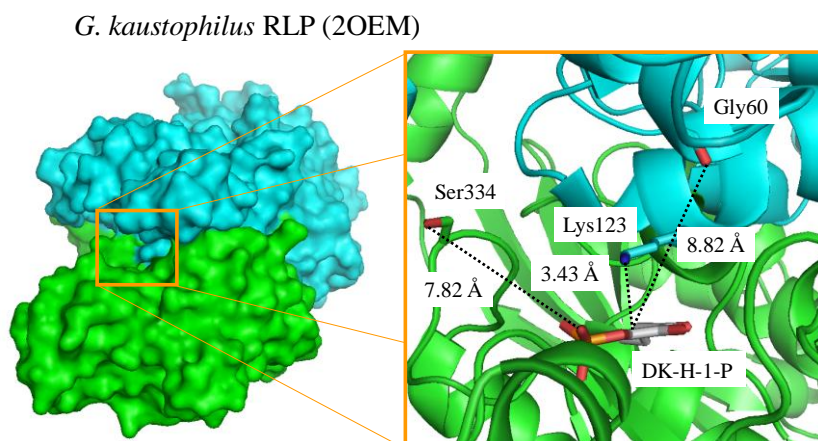
原核生物だけでなく、古細菌、真核生物にも RLP 遺伝子をもつものが多数報告されているが、DK-MTP-1-P エノラーゼ活性が測定されたのは比較的アミノ酸配列の相同性が高い *B. subtilis* と *G. kaustophilus*、*M. aeruginosa* の 3 種だけであった (Ashida et al., 2003; Carré-Mlouka et al., 2006; Imker et al., 2007)。そこで、他の RLP に対しても DK-MTP-1-P エノラーゼ活性の有無を測定し、配列の比較から、触媒に必要なアミノ酸残基を絞り込むことにした。

活性を測定した結果、*B. subtilis* と *M. aeruginosa* 以外の RLP、*R. rubrum* IV と *C. tepidum*、*R. palustris* IV-2、*B. bronchiseptica* の RLP では DK-MTP-1-P のエノラーゼ活性は検出できなかった (Table 4-1)。

| Origin                   | Relative activity (%) <sup>a</sup> |
|--------------------------|------------------------------------|
| <i>B. subtilis</i>       | 100                                |
| <i>M. aeruginosa</i>     | 39.1                               |
| <i>R. rubrum</i> IV      | <0.01                              |
| <i>C. tepidum</i>        | <0.01                              |
| <i>R. palustris</i> IV-2 | <0.01                              |
| <i>B. bronchiseptica</i> | <0.01                              |

<sup>a</sup> The activity with wild type normalized to 100%, which corresponded to 101.6  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ .

RuBisCO の活性に必須な 19 残基の保存性に注目すると、Lys175 と Gly196、Asp198、Lys201、Asp203、His294、Gly403 の 7 残基は RuBisCO と今回測定したすべての RLP で保存されていた (Fig. 4-1B)。一方、Gly60 と Lys123、Ser334 の 3 残基は DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を有している RLP、*B. subtilis* と *G. kaustophilus*、*M. aeruginosa* の 3 種においてのみ保存されており、他の RLP もしくは RuBisCO では別なアミノ酸に置換されていた。それぞれ 3 残基の *G. kaustophilus* の RLP における C1 への距離は 8.82 Å (Gly60)、3.43 Å (Lys123)、7.82 Å (Ser334) と Lys123 が最も引き抜かれるプロトンに近いことがわかった (Fig.4-3)。



**Figure 4-3.** *G. kaustophilus* RLPにおける3残基 (Gly60、Lys123、Ser334) の基質との距離

(左) *G. kaustophilus* RLPの二量体構造の分子表面モデル。単量体を青と緑で色分けして示した。  
 (右) 活性部位の拡大図 (リボンモデル)。左図において四角で囲った活性部位を拡大して表示した。DK-MTP-1-Pエノラーゼ活性が検出された3種*B. subtilis*と*G. kaustophilus*、*M. aeruginosa*のRLPで特異的に保存されていた3残基Gly60、Lys123、Ser334と基質アナログDK-H-1-Pをスティックモデルで表示した。3残基とDK-H-1-Pとの距離を点線で表している。

RuBisCO による RuBP のカルボキシラーゼ反応は5つの段階に分けられる。RuBP のエンジオール化、C2 への CO<sub>2</sub> 付加、水和、開裂、プロトン付加の反応により、ホスホグリセリン酸が2分子できる (Fig. 4-2A) (Cleland, et al., 1998)。最初のステップのエンジオール化は RuBisCO のカルバメート化した Lys201 が Lys175 と協調して RuBP の C3 からプロトンを引き抜くことから始まる。そして、C2 と C3 の間に二重結合をもつ、RuBP のシスエンジオレートができる。一方、DK-MTP-1-P エノラーゼの触媒反応においては、RuBP と構造が似た DK-MTP-1-P の C1 からプロトンが引き抜かれ、C1 と C2 の間に二重結合が生成される (Fig. 4-2A)。RuBisCO のエンジオール化において必須とされる Lys175、Lys201、Asp203、Glu204 の4残基は DK-MTP-1-P エノラーゼ活性が検出できた3種 *B. subtilis* と *G. kaustophilus*、*M. aeruginosa* の RLP で完全に保存されていた (Fig. 4-1B)。この4残基は RuBisCO と RLP の活性部位の構造を比較しても、立体的位置が類似しており、DK-MTP-1-P エノラーゼにおいても重要であると考えられた (Fig. 4-2B) (Andersson, 1996; Imker et al., 2007)。

これら4残基と DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を有する RLP 特異的であり、プロトンが引き抜かれる C1 に近接する Lys123 について他のアミノ酸への置換変異を施し、DK-MTP-1-P エノラーゼにおける機能的役割を評価した。すべてのタンパク質は大腸菌において可溶化し、野生型と同様に精製することができた。Native-PAGE やゲルろ過カラムによる解析から、変異 RLP も野生型と同様のホモ二量体を形成していることがわかった (data not shown)。このことから、活性部位を形成するこれら4残基は *B. subtilis* の RLP において基本的な立体構造に影響を与えないことがわかった。

Lys123 をアラニン、アスパラギン、イソロイシン、またはグルタミン酸に置換した場合、活性は完全に無くなった (Table 4-2)。Lys175 や Lys201 をアラニン、イソロイシン、グルタミン酸に置換した場合も同様に失活した。しかし、電荷が変わらないように、Asp203 をグルタミン酸に、Glu204 をアスパラギン酸に置換を施した場合、変異 RLP はエノラーゼ活性を保持していた。また、電荷が無くなるように Asp203 をアスパラギンに、

Table 4-2. DK-MTP-1-P enolase activities of mutant RLPs

| Mutation  | Relative activity (%) <sup>a</sup> |
|-----------|------------------------------------|
| Wild type | 100                                |
| K123A     | <0.01                              |
| K123N     | <0.01                              |
| K123I     | <0.01                              |
| K123E     | <0.01                              |
| K175A     | <0.01                              |
| K175I     | <0.01                              |
| K175E     | <0.01                              |
| K201A     | <0.01                              |
| K201I     | <0.01                              |
| K201E     | <0.01                              |
| D203E     | 7.0                                |
| D203N     | <0.01                              |
| E204D     | 84.0                               |
| E204Q     | <0.01                              |

<sup>a</sup> Same as table 1

Glu204 をグルタミンに置換した場合は変異 RLP の活性が失われた。

DK-MTP-1-P エノラーゼ活性が検出できた D203E と E204D に関して、速度パラメーターを求めて、野生型と比較した (Fig. 4-4)。

野生型の  $V_{max}$  と DK-MTP-1-P に対する  $K_m$  はそれぞれ  $112.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$  と  $11.7 \mu\text{M}$  である。Asp203 のカルボキシルメチル基をカルボキシルエチル基に置換すると、 $V_{max}$  と  $K_m$  はそれぞれ  $7.9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$  と  $9.1 \mu\text{M}$  になった。逆に Glu204 の側鎖を短くするような変異、カルボキシルエチル基からカルボキシルメチル基への置換による影響は比較的小さく、 $V_{max}$  と  $K_m$  はそれぞれ  $94.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$  と  $22.4 \mu\text{M}$  になった。これらの結果から、Asp203 と Glu204 の側鎖は負の電荷が活性に必須であるが、側鎖の長さは比較的影響が少なく、Asp203 と Glu204 では、Asp203 の側鎖の長さが活性に対してより重要であるということがわかった。

RuBisCO はプロトン化していない Lys201 の  $\epsilon$ -アミノ基に  $\text{CO}_2$  と  $\text{Mg}^{2+}$  が結合することで活性化する (Lorimer, 1981)。カルバメート化した Lys201 が RuBP の C3 のプロトンを引き抜き、エンジオール化を進行させる。そこで *B. subtilis* DK-MTP-1-P エノラーゼにおいても同様の機構の有無を検証した。つまり、DK-MTP-1-P エノラーゼも RuBisCO と同じような反応機構であるならば、Lys201 のカルバメート化に依存した中性付近の pKa を持ち、活性に  $\text{CO}_2$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を必要とすると考えられた。

活性測定の結果から *B. subtilis* DK-MTP-1-P エノラーゼの至適 pH は 8.2 で、pH 7.0 の時の活性は至適 pH の時の活性の 10 分の 1 以下であった (Fig. 4-5A)。このことから、pKa が pH 7.0 から pH 8.2 にあるアミノ酸残基が活性に重要な役割を果たしていることが考えられた。

無機炭素をアルカリ性のバッファーから完全に除去することは不可能なので、無機炭素の溶解度をできるだけ下げ、その時の  $\text{CO}_2$  濃度を正確に測定し、高  $\text{CO}_2$  濃度の場合と活性を比較することにした。Mili-Q 水で調整したバッファーに窒素ガス (>99.99%) を通気しながら、100 度で 30 分間沸騰させたものを  $\text{CO}_2$  フリーバッファーとした (Matsuda and Colman, 1996)。その  $\text{CO}_2$  フリーバッファーを用いて Sephadex G-25 を平衡化し、MtnW と MtnB をそれぞれ 0.1 mg/ml、2 mg/ml

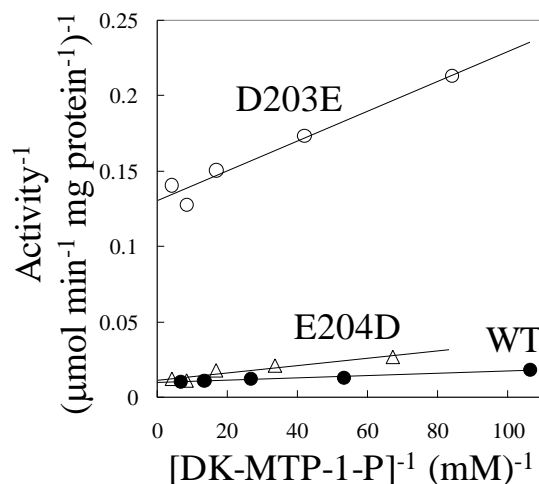
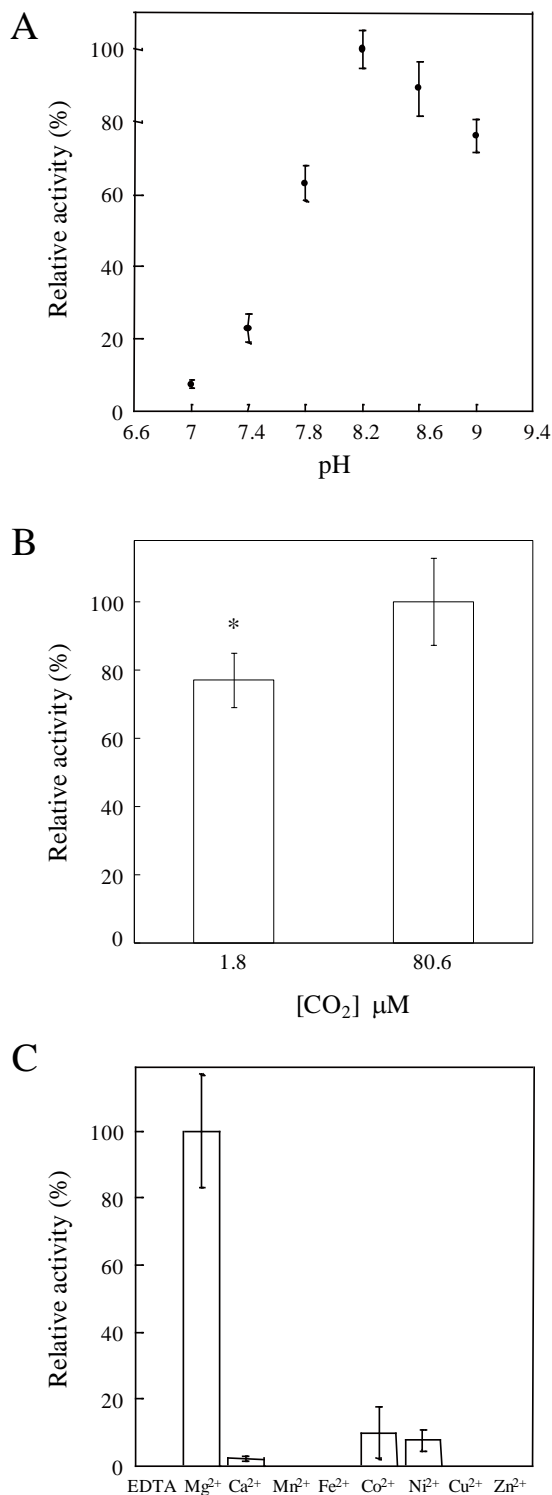


Figure 4-4. 野生型と変異DK-MTP-1-Pエノラーゼのラインウィーバー・バークプロット  
野生型を●、D203Eを○、E204Dを△でプロットした。

含むタンパク質混合液を供し、バッファー交換を行った。活性測定後の  $\text{CO}_2$  フリーバッファーの溶存無機炭素濃度は  $0.21 \text{ mM}$  で、測定条件の pH、イオン強度、温度から  $\text{CO}_2$  濃度は  $1.77 \mu\text{M}$  であることがわかった (Yokota and Kitaoka, 1985)。 $\text{CO}_2$  フリーバッファーに終濃度が  $10 \text{ mM}$  になるように  $\text{NaHCO}_3$  を加えて活性を測定し、無機炭素濃度と  $\text{CO}_2$  濃度を求めたところ、それぞれ  $9.34 \text{ mM}$  と  $80.64 \mu\text{M}$  であった。DK-MTP-1-P エノラーゼ活性は高  $\text{CO}_2$  濃度 ( $80.64 \mu\text{M}$ ) の場合に比べて低  $\text{CO}_2$  濃度 ( $1.77 \mu\text{M}$ ) では  $77\%$  程度にまで減少した (Fig. 4-5B)。

精製した DK-MTP-1-P エノラーゼを  $10 \text{ mM}$  の EDTA 共存下で 4 度に  $30$  分間静置し、あらかじめ  $50 \text{ mM}$  トリス塩酸バッファー (pH  $8.2$ ) に平衡化した NAP-5 カラムを用いてバッファー交換を行い、EDTA を取り除いた。種々の金属を終濃度  $1 \text{ mM}$  になるように添加した場合、もしくは添加しなかった場合の活性を比較した (Fig. 4-5C)。DK-MTP-1-P エノラーゼ活性は金属無しでは検出できなかったが、 $1 \text{ mM}$  の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンを添加することで活性が EDTA 処理前程度にまで復活した。 $\text{Co}^{2+}$  と  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  に関しては非常に低い活性しか検出できず、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  では活性は測定できなかった。



**Figure 4-5. DK-MTP-1-Pエノラーゼ活性に対する $\text{CO}_2$ と金属の影響**

(A) 至適pH。pH  $8.2$ の時の活性を $100\%$ とした。  
 (B)  $\text{CO}_2$ 濃度の活性への影響。沸騰させながら窒素を $30$ 分間通気した $\text{CO}_2$ フリーバッファー ( $1.8 \mu\text{M CO}_2$ ) と  $10 \text{ mM NaHCO}_3$ を含むバッファー ( $80.6 \mu\text{M}$ ) 中での活性比較。 $\text{CO}_2$ 濃度が $80.6 \mu\text{M}$ の時の活性を $100\%$ とした。  
 \*= $P < 0.05$ で有意差あり (t-検定)。(C) 金属の影響。EDTA処理後、EDTAを取り除いたバッファー中の活性 (EDTA) と、それぞれの金属を $1 \text{ mM}$ 含む時の活性。 $\text{Mg}^{2+}$ イオンの時の活性を $100\%$ とした。

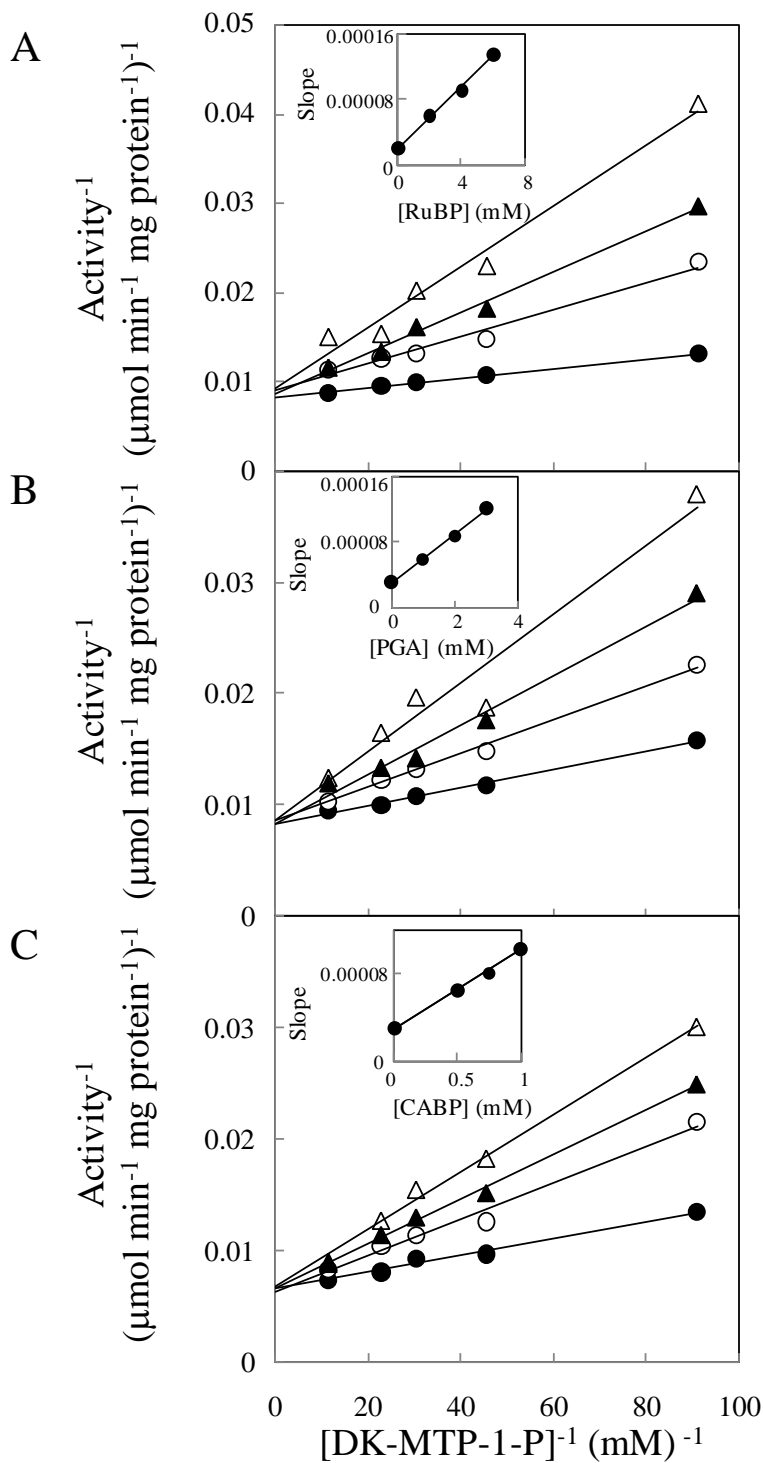
*B. subtilis*DK-MTP-1-P エノラーゼと RuBisCO の基質同士、DK-MTP-1-P と RuBP の基本構造は似ているので (Fig. 4-2A)、両酵素の結合様式の類似性を、基質アナログによる阻害実験より評価した (Table 4-3)。すでに RuBisCO の活性

Table 4-3 Inhibition of RLP and RuBisCO by RuBP analogs  
 $K_{DK-MTP-1-P}$  for BsRLP= 11.7  $\mu$ M  $K_{RuBP}$  for spinach RuBisCO = 20  $\mu$ M<sup>a</sup>

| Inhibitor                            | RLP                                | RuBisCO             |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------|
|                                      | Relative activity (%) <sup>b</sup> | $K_i$ ( $\mu$ M)    |
| None                                 | 100.0 $\pm$ 16.2                   | -                   |
| sulfate                              | 98.3 $\pm$ 16.2                    | 630 <sup>a, c</sup> |
| inorganic phosphate                  | 107.4 $\pm$ 18.6                   | 900 <sup>a, c</sup> |
| gluconate                            | 96.1 $\pm$ 25.9                    | -                   |
| 6-phosphogluconate                   | 95.5 $\pm$ 13.1                    | 8.5 <sup>a, d</sup> |
| xylulose 1,5-bisphosphate            | 88.2 $\pm$ 13.3                    | 5 <sup>e</sup>      |
| ribulose 1,5-bisphosphate            | 84.3 $\pm$ 10.1                    | -                   |
| D-phosphoglyceric acid               | 73.7 $\pm$ 8.0                     | 840 <sup>a, c</sup> |
| 2-carboxyribitol-1,5-bisphosphate    | 95.9 $\pm$ 10.6                    | 1.5 <sup>f</sup>    |
| 2-carboxyarabinitol-1,5-bisphosphate | 68.5 $\pm$ 7.7                     | 0.4 <sup>f</sup>    |

<sup>a</sup> Badger and Lorimer (1981), <sup>b</sup> DK-MTP-1-P concentration was 100  $\mu$ M and inhibitor concentration was 1 mM. <sup>c</sup> Paulsen and Lane (1966), <sup>d</sup> Chu and Bassham (1975), <sup>e</sup> McCurry and Tolbert (1977), <sup>f</sup> Pierce et al., (1980)

を阻害することが知られている物質で DK-MTP-1-P エノラーゼの活性が阻害されるかを調べた (Badger and Lorimer 1981; Paulsen and Lane, 1966; Chu and Bassham, 1975; McCurry and Tolbert, 1977; Pierce et al., 1980)。その結果、硫酸ナトリウム、無機リン酸、グルコン酸、6-ホスホグルコン酸、XuBP を基質 DK-MTP-1-P を 100  $\mu$ M に対して 1 mM 添加しても顕著な阻害は見られなかった。一方、RuBisCO の基質と生成物である RuBP と PGA は低いながらも有意に DK-MTP-1-P の活性を阻害した。これらの阻害様式は競合阻害であった (Fig. 4-6)。遷移状態アナログの CABP ではより強い阻害がみられた。CABP の阻害定数は 414  $\mu$ M で、PGA や RuBP の阻害定数、それぞれ 1030、1140  $\mu$ M よりも低かった。興味深いことに、CABP (2-カルボキシアラビニトール 1,5-ビスリン酸) の構造異性体の CRBP (2-カルボキシリビトール 1,5-ビスリン酸) はまったく阻害効果をもたなかった (Table 4-3)。CABP と CRBP は C2 の側鎖の向きが異なるだけの光学異性体である (Fig. 4-2A)。また、同じ条件下で MtnB の活性は阻害されないことを確かめた (data not shown)。



**Figure 4-6. DK-MTP-1-Pエノラーゼ活性に対する RuBisCOの基質、生成物、遷移状態アナログの阻害効果**

(A) RuBP、(B) PGA、(C) CABPの阻害効果を表している。それぞれ (A) 阻害剤無し (●)、2 mM (○)、4 mM (▲)、6 mM (△) の RuBP を加えた場合、(B) 阻害剤無し (●)、1 mM (○)、2 mM (▲)、3 mM (△) の PGA を加えた場合、(C) 阻害剤無し (●)、0.5 mM (○)、0.75 mM (▲)、1 mM (△) の CABP を加えた場合の活性をラインウィーバー・バークプロットで示した。

#### 4-4 考察

*B. subtilis* の RLP (MtnW) は RuBP に対して CO<sub>2</sub> 固定反応を触媒できないが、RuBisCO と興味深い多くの機能的類似性を見つけることができた。現時点で DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を検出できた RLP は *B. subtilis*、*M. aeruginosa*、*G. kaustophilus* 由来の 3 種類だけで (Ashida et al., 2003; Carré-Mlouka et al., 2006; Imker et al., 2007)、*R. palustris* IV-2、*R. rubrum*、*C. tepidum*、*B. bronchiseptica* 由来の RLP では DK-MTP-1-P エノラーゼ活性は検出できなかった (Table 4-1)。このことから DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を持つ RLP は *B. subtilis* とそのごく近縁種に限られていることが新たにわかった (Fig. 4-1A)。そこでこのエノラーゼ活性の有無を決めているアミノ酸残基を明らかにすべく、RLP 間のアミノ酸配列を比較した (Fig. 4-1B)。エノラーゼ活性の必須残基は活性が検出できた RLP で高度に保存されているはずである。さらに、種々の RuBisCO と *G. kaustophilus* や *C. tepidum*、*R. palustris* IV-2 の RLP の結晶構造の比較から、両者の立体構造が非常に似ており、RuBisCO の 19 の触媒必須残基が RLP においても基質結合ポケットの周辺に位置していることがわかっている (Li et al., 2005; Imker et al., 2007; Tabita et al., 2007) (Fig. 4-2B)。つまり、RuBisCO の 19 の触媒必須残基に相当する RLP のアミノ酸残基の内、エノラーゼ活性を示す RLP で特異的に保存されているアミノ酸は、DK-MTP-1-P エノラーゼにおける触媒残基である可能性が高いと予想された。以上の条件を満たす Gly60 と Lys123、Ser334 の 3 残基の内、基質と 4 Å 以内の距離にあるのは Lys123 だけであったために、Lys123 が触媒残基の有力候補であると考えられた (Fig. 4-3)。

*B. subtilis*、*M. aeruginosa*、*G. kaustophilus* の RLP が触媒する DK-MTP-1-P エノラーゼ反応は RuBisCO が触媒するカルボキシラーゼ反応の第一ステップである RuBP のエンジオール化に似ている (Fig. 4-2A)。基質である DK-MTP-1-P は C1 位にリン酸基、C2 位にケト基を持つ 5 炭糖という点で RuBisCO の基質 RuBP と構造が類似し、さらに反応も、DK-MTP-1-P の C1 のプロトンを引き抜き C1 と C2 の間に二重結合を形成するのに対して、RuBisCO では RuBP の C3 のプロトンを引き抜き C2 と C3 の間に二重結合を形成するという様に相同性が高い。RuBisCO で RuBP のエンジオール化に必須である 4 つのアミノ酸 Lys175、Lys201、Asp203、Glu204 は、その変異によって、RuBisCO の RuBP エンジオール化活性を失わせる (Hartman et al., 1987; Gutteridge et al., 1988; Smith and Hartman 1988; Smith et al., 1988)。DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を示す *B. subtilis*、*M. aeruginosa*、*G. kaustophilus* の RLP でもこれら 4 残基は保存されていた。そこで DK-MTP-1-P エノラーゼにおいても、これら 4 残基が RuBisCO と同様に活性に重要な役割を果たしていることが予想された。そこでこの RuBisCO と DK-MTP-1-P エノラーゼで共通する 4 残基と DK-MTP-1-P エノラーゼ特有の

Lys123 に対して、部位特異的変異を施し、活性に対する影響を調べた (Table 4-2)。

*B. subtilis* の RLP に対して、123 番目のリジンをアラニンやアスパラギン、イソロイシン、グルタミン酸などに置換すると活性が失われた (Table 4-2)。この結果から Lys123 は DK-MTP-1-P エノラーゼにおいて DK-MTP-1-P の C1 の水素を引き抜く触媒塩基ではないかと考えられた。しかしながら、123 番目のリジンがアスパラギンになっている *R. rubrum* の RuBisCO もわずかではあるが DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を持っている (Fig. 4-1B) (Ashida et al., 2003)。以上のことから、Lys123 が DK-MTP-1-P エノラーゼと RuBisCO に共通した触媒塩基ではないのかもしれない。*R. rubrum* の RuBisCO においては DK-MTP-1-P エノラーゼとは別なアミノ酸が触媒塩基として働いているのかもしれない。

RuBisCO においては、Lys201 のカルバミル化した $\epsilon$ -アミノ基が RuBP の C3 の水素を引き抜く触媒塩基であるということが広く受け入れられている (Lorimer, 1981)。そのため、カルバミル化した Lys201 は DK-MTP-1-P エノラーゼにおいても触媒残基の候補として考えられた。実際に 201 番目のリジンをアラニンやイソロイシン、グルタミン酸に置換した変異 RLP ではすべて活性が失われた (Table 4-2)。それらアラニンやイソロイシン、グルタミン酸はすべてカルバミル化されないアミノ酸である。この結果は K201A が野生型と変わらない活性を示すと報告していた *G. kaustophilus* の RLP を用いた実験結果と矛盾する (Imker et al., 2007)。これは実験手法の違いに起因するのかもしれない。本研究では活性を分光学的手法によって求めているが、Imker らは NMR を用いている。Imker らも基質アナログである DK-H-1-P を用いて分光学的手法によって K201A の活性を測った場合は、野生型の 3% 以下にまで減少していると報告している。もしくは、*B. subtilis* と *G. kaustophilus* RLP の種間の違いによるのかもしれない。

Lys201 に結合したカルバメートイオンが Asp203 や Glu204 と協調して  $Mg^{2+}$  イオンの結合に働いていることは RuBisCO と *G. kaustophilus* RLP において共通していた (Fig. 4-2B) (Andersson, 1996; Imker et al., 2007)。もし、カルバメート化された Lys201 がプロトンの引き抜きに関わっているのであれば、活性に pH や  $CO_2$ 、 $Mg^{2+}$  イオンの影響が表れるはずである。*B. subtilis* の DK-MTP-1-P エノラーゼ活性は pH 8.2 で最も高い活性を示し、低  $CO_2$  濃度で活性が低下し、 $Mg^{2+}$  イオンを特異的に要求することを明らかにした (Fig. 4-5A, B, C)。この性質はすべて RuBisCO と共通する。また、 $Mg^{2+}$  イオン結合残基の Asp203 と Glu204 の特に負電荷が活性に必須であるという結果からも、 $Mg^{2+}$  イオンの結合が活性に必須であることが支持された (Table 4-2, Fig. 4-4)。しかしながら、1.8  $\mu M$  という極めて低濃度の  $CO_2$  条件下においても高  $CO_2$  濃度 (80.64  $\mu M$ ) の場合と比べて 77% の活性を保持していたことから、カルバメート化が DK-MTP-1-P エノラーゼ活性に必須であるかどうかはわからない。もし 1.8  $\mu M$  の濃度で Lys201 の約 8



割がカルバメート化していたとすれば、*B. subtilis* の DK-MTP-1-P エノラーゼの CO<sub>2</sub> 親和性は極めて高いことになる。ホウレンソウの RuBisCO は Mg<sup>2+</sup> イオンを含む CO<sub>2</sub> フリーバッファー (pH 4.0~4.5 で窒素を通気した後に炭酸塩を含まない NaOH で pH 8.2 に調整した) 中で、高 CO<sub>2</sub> 濃度の 18% の活性しか示さない (Lorimer et al., 1976)。実際に低 CO<sub>2</sub> 濃度において *B. subtilis* の DK-MTP-1-P エノラーゼの Lys201 がカルバメート化の修飾を受けているかどうかは、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の取り込み実験により明らかにできる。

別な触媒塩基の候補として Lys175 が挙げられる。*R. rubrum* の RuBisCO において Lys175 はきわめて低い pKa 7.9 を示す (Hartman et al., 1985)。この低い pKa は DK-MTP-1-P エノラーゼの pH 依存性のカーブに合致する (Fig.4-5A)。また、Lys175 もアラニンやイソロイシン、グルタミン酸などの他のアミノ酸に置換することで DK-MTP-1-P エノラーゼ活性が失われた (Table 4-2)。しかしながら、Lys175 は DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を持っている持っているに関わらず、すべての RuBisCO と RLP で共通に保存されていることから、エノラーゼ活性における Lys175 の役割は未だわからない。

アミノ酸配列全体の相同性は 25% と低いながらも、ホウレンソウの RuBisCO と *G. kaustophilus* の RLP の活性部位の構造は非常によく似ている (Fig. 4-1A、4-1B、4-2B) (Andersson, 1996; Imker et al., 2007)。DK-MTP-1-P エノラーゼ活性を有する *B. subtilis*、*M. aeruginosa*、*G. kaustophilus* 由来の 3 つの RLP も活性部位のアミノ酸残基は共通している。RuBP の C1 のリン酸基の結合に関わるアミノ酸、Gly381、Gly403、Gly404 は RuBisCO と共通して保存されている (但し、*M. aeruginosa* の Thr404 を除く) (Fig. 4-1B)。対照的に、RuBP の C5 のリン酸基の結合に関わる Arg295 と His327 に相当するアミノ酸は、DK-MTP-1-P エノラーゼにおいてはそれぞれ疎水性アミノ酸のプロリンとロイシンで保存されていない (Fig. 4-1B)。この保存性は、C1 と C5 の両方にリン酸基を有する RuBP と C1 にしかリン酸基を有さない DK-MTP-1-P の基質構造の違いを反映していると考えられる。大変面白いことに、*B. subtilis* の DK-MTP-1-P エノラーゼ活性が、RuBP や CABP のようなビスリン酸で阻害された。 (Table 4-3、Fig. 4-2A、4-6A、4-6C)。このことは、C5 のリン酸基の結合に関わるアミノ酸が無くても、*B. subtilis* の DK-MTP-1-P エノラーゼ (MtnW) が RuBP や CABP を結合できたということである。一般的に酵素は触媒する反応の遷移状態アナログと極めて高い親和性を示す。我々の実験結果から、*B. subtilis* の DK-MTP-1-P エノラーゼが RuBisCO のカルボキシラーゼ反応の遷移状態アナログである CABP と非常に高い親和性を示すことが明らかになった (Table 4-3、Fig. 4-6A)。さらに、C2 のカルボキシル基が立体異性体の関係にある CRBP では結合できないことがわかった (Table 4-3、Fig. 4-2A)。 *B. subtilis* の DK-MTP-1-P

エノラーゼの CABP に対する  $K_i$  は、ホウレンソウの RuBisCO の  $K_i$  の 1000 分の 1 ではあるが (414 と 0.4  $\mu\text{M}$ ) (Pierce et al., 1980)、*B. subtilis* の RLP は立体特異的に、RuBP のカルボキシラーゼ反応の遷移状態 (エノール化よりも後の段階) を安定化できるかもしれない。すなわち DK-MTP-1-P エノラーゼにも RuBP のカルボキシラーゼ反応を触媒する潜在能力があることを示している。

## 第 5 章

### 結論

メチオニン還元硫黄再生経路は、ポリアミン合成における副産物であるメチルチオアデノシン (MTA) に含まれる還元硫黄をメチオニンに再生する経路である。同経路を構成する反応の内、メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼ (MtnA)、メチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼ (MtnB)、2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼ (MtnW : RLP) の3酵素は、アミノ酸配列において他の機能を持つタンパク質と相同性を示し、かつ同じ物質を基質とする酵素が他に無いというユニークな酵素であることから、*B. subtilis* リコンビナントタンパク質を用いて酵素学的諸性質を決めると共に、反応機構を解析した。相同性を持つタンパク質同士の比較から、それぞれの機能分化の過程が示唆された。

まず第2章において、アミノ酸配列が真核型翻訳開始因子 (eIF) 2 の GDP/GTP 交換反応の調節に関わっていると考えられる eIF2B の $\alpha$ サブユニットと約 20%の相同性を有しているメチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼ (MtnA) を解析した。基質はヘミアセタール基にリン酸を有するので鎖状型アルドースを形成できない。そのようなアルドース糖の開環反応を触媒する酵素の速度定数を明らかにしたのは本研究が初めてである。また、重水を用いた NMR 解析や MS 解析の結果から、触媒時のプロトン移動の際に溶媒からのプロトンの取り込みが極めて起こり難いことを明らかにした。相同性を持つタンパク質の基質結合理型、非結合理型の立体構造の比較から、活性中心が基質結合に伴い大きく構造を変化させ、活性中心を外界から遮断することが予想され、触媒中に溶媒とのプロトン授受が起こり難いという実験結果と合致した。これらのことから、本酵素はエンジオール機構で触媒を行う一般のアルドース/ケトースイソメラーゼとは異なる新規な反応機構を有していることが示唆された。

次に第3章において、アミノ酸配列がクラスII型のアルドラーゼファミリーと約 20%の相同性を有しているメチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼ (MtnB) を解析した。同ファミリーにはデヒドラターゼ活性を持つ酵素の報告はなかったが、金属結合やリン酸結合、プロトンの授受に働くとされるアミノ酸が保存されており、活性中心や反応機構は共通していることが予想された。実際に金属を強固に結合させており、部分的に金属を取り除くことで活性が大幅に減少したことから、他のアルドラーゼファミリーと同様に、触媒に金属を必要とすることが明らかになった。生成物である 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸は不安定で、素早く分解されるため、メチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼに対して、生成物の 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸を基質とするエノラーゼの量比を低くすると、分解の影響により、エノラーゼの生成物の量が著しく減少した。多くの生物においてこのデヒドラターゼとエノラーゼがオペロンを形成していることは、両酵素の量比を調節すること

で代謝効率を高めるために重要であると考えられた。

第4章において解析した 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼ (MtnW : RLP) は、アミノ酸配列において光合成/化学合成における CO<sub>2</sub> 固定酵素 リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) と約 20%の相同性を示す。活性に必須で RuBisCO 内で極めて保存性の高い 19 残基の内、*B. subtilis* のエノラーゼ (MtnW) は 11 残基を共通に保持していた。触媒反応は RuBisCO の触媒反応の第一ステップ (エンジオール化) と基質構造や反応の面で非常に良く似ており、*R. rubrum* の RuBisCO がエノラーゼの活性を有していたことから両酵素の機能が部分的に重複していると考えられていた。本研究ではエノラーゼの酵素としての特徴づけを行い、活性に Mg<sup>2+</sup>を必要とし、CO<sub>2</sub> 共存下で活性が増加する性質が RuBisCO と共通していることを明らかにした。エノラーゼにおける触媒残基を明らかにするために、RuBisCO のエンジオール化における必須触媒残基に相当するアミノ酸残基に対して置換変異を施したところ、変異エノラーゼはすべて活性を失った。また、RuBisCO の基質、反応中間体、生成物がいずれもエノラーゼの活性を競合的に阻害した結果から、エノラーゼは RuBisCO と似た結合特異性を持つ活性中心を有し、エノール化の反応においては RuBisCO が行うエンジオール化と同様の触媒残基を用いていることが示唆された。配列から予想された以上に、構造や機能面において RuBisCO と非常に高い相同性を有していることから、RuBisCO とエノラーゼは分子進化上非常に深い関係にあると考えられた。

仮に、イソメラーゼが eIF2B $\alpha$ に、デヒドラターゼがアルドラーゼに、エノラーゼが RuBisCO にそれぞれ分子進化したとすれば、単にタンパク質の機能が変わったというだけでなく、果たす役割も変化したことになる。タンパク質の機能分化の多様性が非常に高いことを示している。一方で、エノラーゼと RuBisCO のように両者の構造が非常に似ているとすれば、構造を変えずにそのような多様な機能分化が起こったということであり、大変興味深い。構造変化を伴わない機能分化が可能であった原因を考えてみる。

エノラーゼ (RLP : MtnW) と RuBisCO (RuBP カルボキシラーゼ) の場合、プロトンを引き抜き、エノール型化合物を生成するという点は共通している。RuBisCO では、さらにそのエノール型化合物に対して、カルボキシル化、水和、開裂、プロトン付加と多段階の反応が進行する。*R. rubrum* の RuBisCO が RLP の基質 DK-MTP-1-P に対してはエノール化反応のみを触媒したことから考えると、エノール化反応後の生成物の化学的性質が、その後の反応にとって重要であることが考えられた。現在のところ、*B. subtilis* の RLP が、RuBisCO の基質である RuBP のエノール化を触媒できるかどうかはわかっていない。しかし、第4章において、エノール化反応後のカルボキシラーゼ反応中間体アナログで

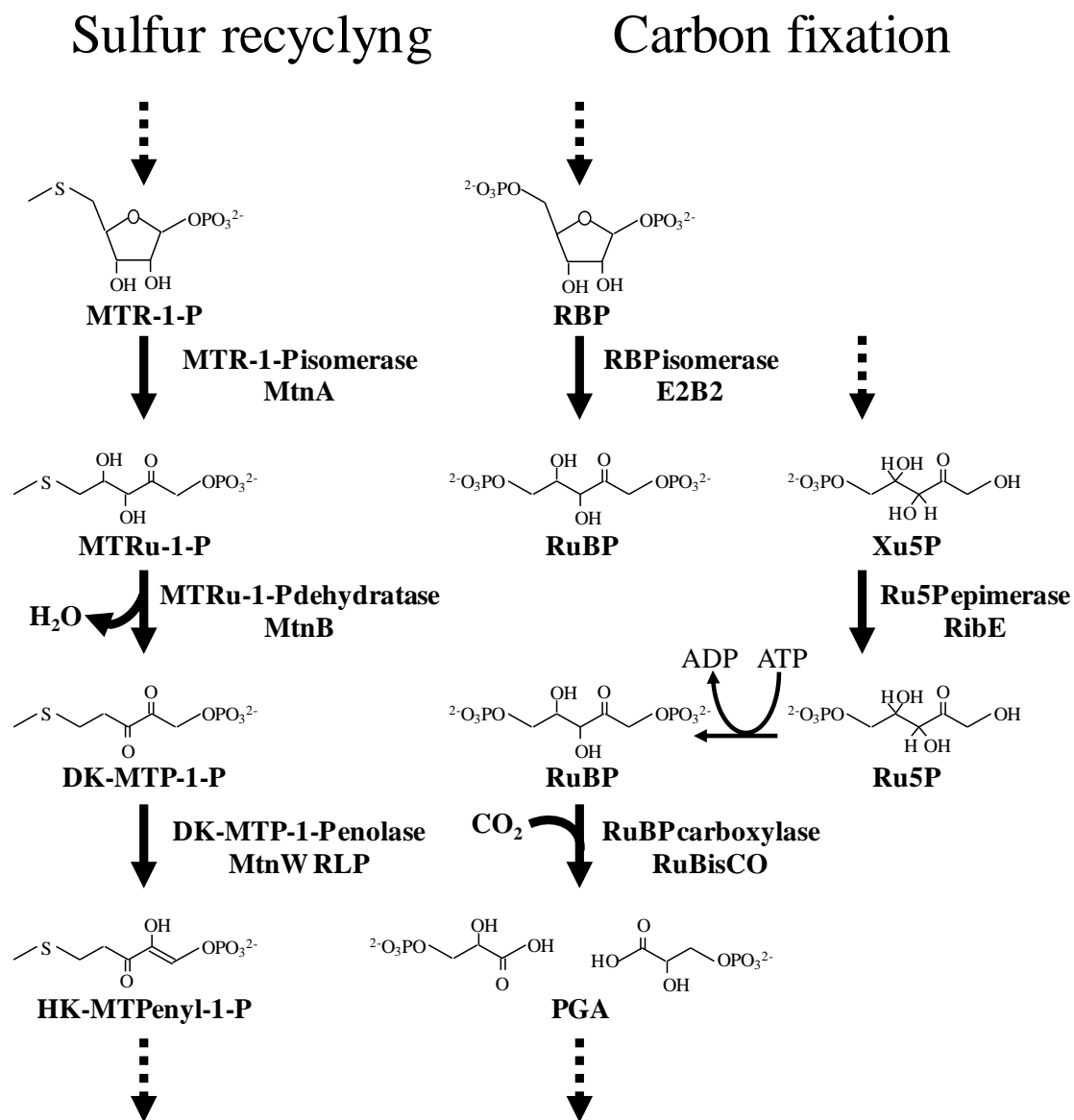
ある CABP に RLP が特異的に結合できたことから、RLP もエノール化以降の反応を触媒できる能力を有していることが予想された。RLP から RuBisCO への分子進化で大きな構造変化を伴わなかった原因は、RLP が潜在的に RuBP のカルボキシラーゼ反応の遷移状態を安定化できる能力、つまりはカルボキシラーゼ反応の触媒能力を保持していたからだと考えられた。

デヒドラターゼ (MtnB) とアルドラーゼ (FucA/RhuA/RibE) の場合、デヒドラターゼの結晶構造が未だ明らかになっていないため、直接立体構造を比較することができない。しかし、第 3 章で解析した結果、アルドラーゼファミリーの活性中心で保存されている金属結合部位がデヒドラターゼでも保存されており、金属を部分的に取り除くことで活性が低下したことから、デヒドラターゼの活性中心の構造もアルドラーゼと同様であると考えられた。反応機構を予測した場合、プロトンを引き抜く位置がデヒドラターゼとアルドラーゼでは異なり、デヒドラターゼでは 3 位のプロトンが引き抜かれるのに対し、アルドラーゼファミリーの FucA/RhuA/RibE では 4 位のヒドロキシル基のプロトンが引き抜かれる。同様のことがエノラーゼにおいて当てはまる。エノラーゼでは 1 位のプロトンが引き抜かれるが、RuBisCO では 3 位のプロトンが引き抜かれる。この基質において引き抜かれるプロトンの相対的な位置の違いが、反応の違いに反映されていると考えられた。プロトンが引き抜かれる炭素原子同士、もしくは炭素原子と酸素原子の相対的な距離は 3 Å 以内であり、非常に近接している。このことが、構造を変えずに反応性の異なる酵素を生み出すことを可能にした原因であると考えられた。

イソメラーゼ (MtnA) の場合、eIF2B $\alpha$  の機能がわからないために直接両者の相関関係を述べることはできないが、MtnA が触媒に伴い立体構造を変化させると予想されたことから、eIF2B $\alpha$  も立体構造が変化し、その機能に大きな役割を果たしているのではないかと考えられた。

代謝経路を比較した場合、MtnA と相同性を持ち、同じく糖リン酸のイソメラーゼとして働く E2B2 は、AMP 代謝経路で、リボース 1,5-ビスリン酸 (RBP) から、RuBP を生成する。MtnB と相同性を持つリブローース 5-リン酸 4-エピメラーゼ (RibE) も、キシルロース 5-リン酸 (Xu5P) から Ru5P を生成し、キナーゼにより Ru5P は RuBP に変換される。MtnW と相同性を持つ RuBisCO は RuBP に CO<sub>2</sub> を固定するカルボキシラーゼ反応を触媒する。つまり、*B. subtilis* において硫黄代謝経路で働く MtnA、MtnB、MtnW の 3 酵素と相同性を持つ、それぞれ E2B2、RibE、RuBisCO はすべて RuBP を介した CO<sub>2</sub> の固定経路に関わっている (Fig. 5-1)。硫黄代謝経路と炭素代謝経路の酵素群が相同性を持っているということは、両代謝経路の成り立ちを考える上で非常に興味深い。昔の生物においては両代謝経路において同一の酵素が働いていた、もしくは、どちらかの経路

の酵素が機能分化により、全く異なる経路において似た触媒反応を示すことになったのかもしれない。



**Figure 5-1. MtnA、MtnB、MtnWとその相同性を持つ酵素が働く代謝経路の比較**

MTR-1-Pイソメラーゼ (MtnA) とRBPイソメラーゼ (E2B2)、MTRu-1-Pデヒドラターゼ (MtnB) とRu5Pエピメラーゼ (RibE)、DK-MTP-1-Pエノラーゼ (MtnW: RLP) とRuBPカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) はそれぞれアミノ酸配列において相同性を持つ酵素同士であるが、MtnAとMtnB、MtnWはメチオニン還元硫黄代謝経路で働き (左側)、E2B2とRibE、RuBisCOはRuBPにCO<sub>2</sub>を固定する炭酸固定経路で働く。

そこでMtnA、MtnB、MtnWを含む、メチオニン還元硫黄再生経路の酵素群の生物界における分布を調べた (Table 5-1)。

**Table 5-1. メチオニン還元硫黄再生経路酵素群の分布**

メチオニン還元硫黄再生経路を構成する10種の酵素群 (MtnN、K、P、A、B、W、X、C、D、E) のオルソログ解析。ゲノムネット (<http://www.genome.jp/ja/>) 上で行ったSSDB Forward Best Search Resultの解析結果を表にまとめた。アミノ酸配列の相同性をSW-scoreで表した。MtnPとMtnCはヒトの、その他の酵素は全て*B. subtilis*のアミノ酸配列との相同性を示している。基準とした*Homo sapiens*のMtnPとMtnC、*B. subtilis*のMtnN、K、A、B、W、X、D、EのSW-scoreや、SW-scoreが100以下の場合は数値を表記していない。SW-scoreが200以上の場合は背景を黒くした。メチオニン還元硫黄再生経路が回るのに必要な酵素セット (N & K or P、A、B、W & X or C、D、E) を合わせもつ (SW-score が200以上の) 生物種に○をつけた。

| Category                            | species                                     | code  | MtnN | MtnK | MtnP | MtnA | MtnB | MtnW | MtnX | MtnC | MtnD | MtnE | MSP  |     |
|-------------------------------------|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Animals                             | Mammals                                     | <i>Homo sapiens</i> (human)                             | hsa  |      | 108  | 713  | 286  | 117  | 151  |      | 247  | 396  | ○    |     |
|                                     |   | <i>Mus musculus</i> (mouse)                             | mmu  |      | 106  | 1787 | 705  | 281  | 112  | 147  | 1567 | 260  | 378  | ○   |
|                                     | Insects                                     | <i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)              | dme  |      | 123  | 1136 | 758  | 260  | 103  | 148  | 629  | 231  | 380  | ○   |
| Plants                              | Nematodes                                   | <i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)                | cel  |      | 123  | 945  | 673  | 172  | 112  | 199  | 605  | 213  | 382  |     |
|                                     | Dicotyledons                                | <i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress)               | ath  | 232  | 854  | 122  | 727  | 277  | 376  | 142  | 420  | 248  | 506  | ○   |
|                                     | Monocotyledons                              | <i>Oryza sativa japonica</i> (Japanese rice)            | osa  | 269  | 823  |      | 753  | 269  | 368  | 136  | 705  | 266  | 474  | ○   |
|                                     | Red algae                                   | <i>Cyanidioschyzon merolae</i>                          | cme  | 108  | 105  | 235  | 670  | 265  |      |      | 107  | 242  | 510  |     |
|                                     | Green algae                                 | <i>Ostreococcus lucimarinus</i>                         | olu  | 227  | 816  | 104  | 728  |      | 523  | 135  | 102  |      | 533  |     |
| Fungi                               | Ascomycetes                                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                         | sce  |      | 119  | 488  | 685  | 270  | 107  | 232  | 407  | 221  | 340  | ○   |
|                                     | Basidiomycetes                              | <i>Cryptococcus neoformans</i> JEC21                    | cne  |      | 116  | 590  | 697  | 202  | 107  | 211  | 107  | 242  | 381  |     |
| Protists                            | Cellular slime mold                         | <i>Dictyostelium discoideum</i>                         | ddi  | 139  | 109  |      | 808  | 264  | 104  | 108  | 620  | 303  | 389  |     |
| Proteobacteria                      | Gamma/enterobacteria                        | <i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655                     | eco  | 832  | 110  | 233  |      | 149  | 105  |      | 103  |      | 934  |     |
|                                     |   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                            | kpn  | 819  | 995  |      | 818  | 361  |      |      | 529  | 296  | 1029 | ○   |
|                                     |   | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi CT18           | stv  | 840  | 112  | 240  | 104  | 141  | 110  | 101  | 101  |      |      | 945 |
|                                     | Gamma/others                                | <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c                          | xfx  | 105  |      | 386  | 903  | 388  | 108  |      | 456  | 302  | 421  | ○   |
|                                     |   | <i>Vibrio cholerae</i> O1                               | vch  | 845  | 118  |      | 106  | 112  | 103  |      |      | 103  | 366  |     |
|                                     |   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1                      | pae  | 119  | 109  | 453  | 884  | 369  | 114  | 111  | 509  | 316  | 942  | ○   |
|                                     | Beta  | <i>Neisseria meningitidis</i> MC58 (serogroup B)        | nme  | 729  | 117  |      | 101  |      | 123  |      |      | 110  | 490  |     |
|                                     |   | <i>Bordetella bronchiseptica</i>                        | bbr  | 414  | 107  |      | 113  | 145  | 448  |      |      |      | 904  |     |
|                                     | Epsilon                                     | <i>Helicobacter pylori</i> 26695                        | hpy  | 419  | 101  | 104  | 106  |      |      | 111  |      | 113  | 412  |     |
|                                     |   | <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC11168                   | cje  | 495  |      | 103  | 104  |      | 116  |      | 103  |      | 887  |     |
|                                     | Delta                                       | <i>Geobacter sulfurreducens</i>                         | gsu  | 208  | 100  | 737  | 1004 | 109  | 109  | 103  |      |      | 470  |     |
|                                     |   | <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>                    | ade  | 103  | 100  | 734  | 886  | 126  | 112  | 302  | 104  |      | 903  |     |
|                                     | Alpha/rickettsias                           | <i>Rickettsia prowazekii</i>                            | rpr  |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 491  |     |
|                                     |   | <i>Ehrlichia ruminantium</i> Welgevonden (South Africa) | eru  |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 114  | 496 |
|                                     | Alpha/rhizobacteria                         | <i>Mesorhizobium loti</i>                               | mlo  | 176  | 837  | 295  | 743  | 138  | 414  |      |      | 113  | 1000 |     |
|                                     |   | <i>Rhodospseudomonas palustris</i> CGA009               | rpa  | 117  | 111  | 702  | 733  | 146  | 478  |      |      | 243  | 918  |     |
|                                     |   | <i>Nitrobacter winogradskii</i>                         | nwi  | 197  | 108  |      |      | 105  | 437  |      |      |      | 947  |     |
|                                     |   | <i>Caulobacter crescentus</i>                           | ccr  | 265  |      |      | 105  |      | 105  |      |      |      | 1046 |     |
|                                     | Alpha/others                                | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1                    | rsp  | 139  | 104  | 739  | 716  | 107  | 400  |      |      |      | 490  |     |
|                                     |   | <i>Rhodospirillum rubrum</i>                            | rru  | 158  | 103  | 667  | 671  | 127  | 404  |      |      |      | 980  |     |
| <i>Magnetococcus</i> sp. MC-1       |   | mgm   | 116  | 135  | 335  | 920  |      | 106  | 119  |      | 101  | 1024 |      |     |
| <i>Acidobacteria bacterium</i>      |   | aba   | 192  | 114  | 671  | 979  | 140  | 112  |      |      | 125  | 588  |      |     |
| Acidobacteria                       | Bacillales                                  | <i>Bacillus subtilis</i>                                | bsu  |      |      | 246  |      |      |      | 103  |      |      | ○    |     |
|                                     |   | <i>Geobacillus kaustophilus</i>                         | gka  | 999  | 1603 | 320  | 1586 | 887  | 1659 | 891  |      | 656  | 1844 | ○   |
|                                     |   | <i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e                     | lmo  | 693  | 103  | 238  |      | 144  | 101  |      |      | 101  | 1829 |     |
|                                     | Lactobacillales                             | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403   | lla  | 564  | 109  |      | 105  |      |      |      | 106  |      | 535  |     |
|                                     |   | <i>Streptococcus pyogenes</i> SF370 (serotype M1)       | spv  | 594  |      | 241  | 119  | 130  | 108  |      |      |      | 573  |     |
|                                     | Clostridia                                  | <i>Clostridium acetobutylicum</i>                       | cac  | 503  | 116  | 283  | 101  | 108  | 102  | 259  | 107  | 106  | 724  |     |
| <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> |   | amt   | 586  | 857  | 280  | 505  | 157  |      |      |      |      | 754  |      |     |
| Mollicutes                          | <i>Mycoplasma genitalium</i>                | mge   | 147  |      |      |      |      |      |      | 100  |      |      |      |     |
|                                     | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv     | mtu   | 424  |      | 532  | 100  | 115  |      | 104  | 132  | 108  | 511  |      |     |
| Actinobacteria                      | <i>Cornebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 | cgl   | 125  |      |      |      |      | 127  |      |      |      | 493  |      |     |
|                                     | <i>Fusobacterium nucleatum</i>              | fnu   | 552  | 758  |      | 483  | 177  |      |      |      |      | 399  |      |     |
| Fusobacteria                        | <i>Rhodopirellula baltica</i>               | rba   | 147  | 110  | 283  | 975  | 130  | 102  |      | 102  |      | 1005 |      |     |
| Planctomyces                        | <i>Chlamydia trachomatis</i> serovar D      | ctr   |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 401  |      |     |
| Spirochete                          | <i>Borrelia burgdorferi</i>                 | bbu   | 553  |      |      | 109  |      |      |      |      |      |      |      |     |
| Cyanobacteria                       | <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803            | svn   |      | 110  | 728  | 999  |      | 397  |      |      |      |      | 984  |     |
|                                     | <i>Synechococcus</i> sp. WH8102             | svw   | 319  |      | 772  | 796  | 376  | 427  |      | 488  | 287  | 705  | ○    |     |
|                                     | <i>Gloeobacter violaceus</i>                | gvi   |      |      | 697  | 884  | 133  | 390  |      |      |      | 1040 |      |     |
| Bacteroides                         | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>         | bth   | 196  | 113  | 260  |      | 141  | 111  | 101  | 107  | 102  | 772  |      |     |
| Green sulfur bacteria               | <i>Chlorobaculum tepidum</i>                | cte   |      | 113  | 307  | 777  |      | 512  | 111  |      |      | 976  |      |     |
| Green nonsulfur bacteria            | <i>Dehalococcoides ethenogenes</i>          | det   |      |      | 824  | 1054 | 101  | 100  | 290  |      |      | 1151 |      |     |
| Deinococcus-Thermus                 | <i>Deinococcus radiodurans</i>              | dra   | 565  | 110  |      | 108  |      | 113  |      | 115  |      | 852  |      |     |
| Hyperthermophilic bacteria          | <i>Thermotoga maritima</i>                  | tma   | 314  | 101  | 259  | 1037 | 169  |      |      |      |      | 585  |      |     |
| Archaea                             | Euryarchaeota                               | <i>Methanococcus jannaschii</i>                         | mja  |      | 105  | 566  | 878  | 161  | 697  |      |      |      | 703  |     |
|                                     |   | <i>Methanosarcina mazei</i>                             | mma  | 111  | 105  | 514  | 853  | 163  | 570  | 105  |      | 106  | 1110 |     |
|                                     |   | <i>Archaeoglobus fulgidus</i>                           | afu  | 118  | 102  | 372  | 870  | 179  | 834  | 108  | 110  | 101  | 1028 |     |
|                                     |   | <i>Pyrococcus horikoshii</i>                            | pho  |      |      | 806  | 949  | 121  | 682  |      |      |      | 672  |     |
|                                     | Crenarchaeota                               | <i>Aeropyrum pernix</i>                                 | ape  | 156  |      | 767  | 752  | 112  |      |      |      |      | 470  |     |
|                                     |   | <i>Sulfolobus solfataricus</i>                          | sso  | 103  |      | 776  | 859  |      |      |      |      |      | 444  |     |
|                                     | Nanoarchaeota                               | <i>Nanoarchaeum equitans</i>                            | neq  |      |      |      | 108  |      |      |      |      |      |      |     |
|                                     |   |   | hit  | 494  | 418  | 409  | 439  | 419  | 455  | 211  | 257  | 294  | 595  |     |
|                                     |   |   | >100 | 304  | 47   | 365  | 250  | 110  | 117  | 47   | 97   | 111  | 584  |     |

酵素の活性が測られている *B. subtilis* の MtnN、K、A、B、W、X、D、E、*Homo sapiens* の MtnP、MtnC を基準に相同性検索を行い、SW-score (Smith-Waterman score) が 200 以上のタンパク質が酵素活性を持っていると仮定した場合、メチオニン還元硫黄再生経路を構成する酵素群をすべて有している生物種は真核生物とγプロテオバクテリア、バチラス属、シアノバクテリアに属していた。Gupta らの進化説によれば、グラム陽性で低 GC 含量のバチラ



ス属は原核生物の中で、一番古い種であり、逆に $\gamma$ プロテオバクテリアが一番新しい種である (Gupta 2003)。つまり、メチオニン還元硫黄再生経路は生物が誕生した極めて初期から真核生物に至るまで連綿と受け継がれてきた経路だと考えられた。メチオニン還元硫黄再生経路内に存在する2つのバイパス経路に関しては、MtnN と MtnK を使って二段階の酵素反応で MTA から MTR-1-P を生成する経路はバチラス属から腸内性 $\gamma$ プロテオバクテリア、植物へと受け継がれ、MtnP のみで MTA から MTR-1-P を生成する経路は、非腸内生 $\gamma$ プロテオバクテリアから動物へと受け継がれた。以上のことから、MtnN と MtnK を使う二段階経路から MtnP のみによる一段階経路へのバイパスの切り替えは $\gamma$ プロテオバクテリアで起こったと考えられた。もう1つのバイパス経路、MtnW と MtnX の2酵素で DK-MTP-1-P から DHK-MTPene (1,2-ジヒドロキシ3-ケト5-メチルチオペンテン) を生成する経路はバチラス属だけに固有であり、他の種では MtnC のみを用いて DK-MTP-1-P から DHK-MTPene を生成していた。このことから、MtnW と MtnX の2酵素経路から MtnC のみによる1酵素経路へのバイパスの切り替えはシアノバクテリア以前に起こったと考えられた。シアノバクテリアでは MtnW と相同性を持つ RuBisCO が炭素固定を行っていることから、シアノバクテリア以前に出現した MtnC により、重複する機能を持つ MtnW が不要になり、MtnW に変異が入りやすくなることで、MtnW から RuBisCO への分子進化、機能分化が起こったと考えられた。それが、硫黄代謝系から炭素代謝経路への変換への引き金になったのではないか。

本研究においては、リコンビナント酵素の活性を測ることによって、主に各酵素の速度パラメーターを求めた。従って配列の比較は行ったものの、相同性を持つタンパク質の機能の差異に重要な構造や部位を特定するまでには至らなかった。おそらくファミリー内で保存性が高い部位が機能特性に重要であると予想される。今後そういう部位に対する変異導入や、相同性タンパク質同士のキメラ酵素の作製、シャッフリングなどの手法により、機能分化に重要な部位や、分子進化の過程を明らかにすることが期待される。

ゲノムプロジェクトによって膨大な遺伝子の配列情報が蓄積され、配列比較から複数のファミリーに分類されている。配列情報に対して、活性などの機能に関する情報は、解析に多大な労力と時間を要するために極端に不足している。本研究で対象とした3酵素も、配列相同性からは機能のまったく異なるタンパク質に分類されていた。配列を基にした遺伝子の網羅的機能予測ではわからなかった、個々のユニークな反応機構や速度定数の解析は、新たな代謝系や制御機構を明らかにするのに役立つだけでなく、ファミリー間の機能差異を明らかにしていくことで、配列や構造と機能の関係を知る上での比較モデルを提供し、ポストゲノム研究における新たな道標を示したと言える。

## 謝辞

奈良先端科学技術大学院大学に入学してからこれまで、多くの方々のお陰で、実にエキサイティングな研究生生活を送ることができました。

研究に対しても、教育に対しても常に熱い横田明穂教授の研究室で過ごせたことは、大学の研究者を目指す私にとってこの上無く恵まれておりました。同じく今まで所属させていただいた分化・形態形成学講座の皆さまにも厚く感謝申し上げます。明石欣也助教、宗景ゆり助教には研究に対するアドバイスをいただけるだけでなく、自分の研究分野以外のテーマの面白さを教えていただき、大変励みになりました。また私が入学してから、博士課程 1 年まで本研究室におられた河内孝之現京都大学教授、竹村美保現石川県立大准教授にも研究室でお互いに快適に過ごす術をお教えいただきました。

また、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科生体高分子構造学講座、児嶋長次郎准教授には本研究に欠かすことのできない NMR スペクトル測定をしていただき、感謝いたしております。

同じく本学バイオサイエンス研究科の横田直彦氏、塚本潤子技官、物質創成科学研究科の西川嘉子技官には MS 解析を行っていただき、研究の主張の核となるデータをご提供いただきました。

フランスパスツール研究所の Danchin 博士、Sekowska 博士、Carre-Mlouka 博士には共同研究者として、試料をご提供していただき、遅々として進まぬ実験結果を辛抱強く待っていただき感謝しております。

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻の大岡宏造准教授には研究試料をいただきました。

同じく大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻の松村浩由准教授、田村はるか氏には本研究で解析した酵素の構造解析を行っていただきました。酵素の機能解析において、活性と構造は車の両輪であり、自分にできない構造解析を協力を推し進めていただいたお陰でより研究を深く掘り下げることができました。

京都大学大学院農学研究科東順一教授には酵素の反応機構モデルを考えるにあたりご助言をいただき感謝いたしております。

本講座の崎山友子氏、中野寿宏氏、田畑宏氏、今城佳余氏には同じ研究チームとして実験のサポートや議論をしていただき感謝いたしております。今までお世話いただいたポスドク、先輩、同輩、後輩、技官、秘書の方々皆さまのおかげで、実り多い研究生生活を送ることができました。最後に本講座に入ってから、卒業にいたるまで、常に暖かく見守り、ご指導いただいた本講座蘆田弘樹助教には重ねて御礼を申し上げます。皆さまありがとうございました。

## 参考文献

Allen, K. N., Lavie, A., Farber, G. K., Glasfeld, A., Petsko, G. A., and Ringe, D. Isotopic exchange plus substrate and inhibition kinetics of  $D$ -xylose isomerase do not support a proton-transfer mechanism. *Biochemistry* **33**, 1481-1487 (1994).

Ames, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Method. Enzymol.* **8**, 115-118 (1966).

Andrews, T. J., and Lorimer, G. H. Rubisco: structure, mechanisms, and prospects for improvement in Biochemistry of Plants, The Biochemistry of Plants, ed. MD Hatch, NK Boardman, 10: 131-218. New York: Academic (1987).

Andersson, I. Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **259**, 160-174 (1996).

Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Yokota, A. A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* **302**, 286-290 (2003).

Ashida, H., Danchin, A., and Yokota, A., Was photosynthetic RuBisCO recruited by acquisitive evolution from RuBisCO-like proteins involved in sulfur metabolism? *Res Microbiol.* **156**, 611-618 (2005).

Avigad, G. Colorimetric ultramicro assay for reducing sugars. *Methods Enzymol.* **41**,

27-29 (1975).

Badger, M. R., and Lorimer, G. H. Interaction of sugar phosphates with the catalytic site of RuBP carboxylase. *Biochemistry* **20**, 2219-2225 (1981).

Balakrishnan, R., Frohlich, M., Rahaim, P. T., Backman, K., and Yocum, R. R. Cloning and sequence of the gene encoding enzyme E-1 from the methionine salvage pathway of *Klebsiella oxytoca*. *J. Biol. Chem.* **268**, 24792-24795 (1993).

Berger, B. J., English, S., Chan, G., and Knodel, M. H. Methionine regeneration and aminotransferases in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **185**, 2418-2431 (2003).

Berrisford, J. M., Hounslow, A. M., Akerboom, J., Hagen, W. R., Brouns, S. J., van der Oost, J., Murray, I. A., Michael, Blackburn, G., Waltho, J. P., Rice, D. W., and Baker, P. J. Evidence supporting a *cis*-enediol-based mechanism for *Pyrococcus furiosus* phosphoglucose isomerase. *J. Mol. Biol.* **358**, 1353-1366 (2006).

Bumann, M., Djafarzadeh, S., Oberholzer, A. E., Bigler, P., Altmann, M., Trachsel, H., and Baumann, U. Crystal structure of yeast Ypr118w, a methylthioribose-1-phosphate isomerase related to regulatory eIF2B Subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 37087-37094 (2004).

Bushman, J. L., Foiani, M., Cigan, A. M., Paddon, C. J., and Hinnebusch, A. G. Guanine

nucleotide exchange factor for eukaryotic translation initiation factor 2 in *Saccharomyces cerevisiae*: interactions between the essential subunits GCD2, GCD6, and GCD7 and the regulatory subunit GCN3. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4618-4631 (1993).

Carré-Mlouka, A., Méjean, A., Quillardet, P., Ashida, H., Saito, Y., Yokota, A., Callebaut, I., Sekowska, A., Dittmann, E., Bouchier, C., and de Marsac, N. T. A new rubisco-like protein coexists with a photosynthetic rubisco in the planktonic cyanobacteria *Microcystis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 24462-24471 (2006).

Christopher, S. A., Diegelman, P., Porter, C. W., and Kruger, W. D. Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16<sup>cdkN2a/ARF</sup>, acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Res.* **62**, 6639–6644 (2002).

Chu, D. K., and Bassham, J. A. Regulation of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase by substrates and other metabolites: further evidence for several types of binding sites. *Plant Physiol.* **55**, 720-726 (1975).

Cleland, W. W., Andrews, T. J., Gutteridge, S., Hartman, F. C., and Lorimer, G. H. Mechanism of Rubisco: the carbamate as general base. *Chem. Rev.* **98**, 549-561 (1998).

Cornell, K. A., Winter, R. W., Tower, P. A., and Riscoe, M. K. Affinity purification of 5-methylthioribose kinase and 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase from *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. J.* **319**, 1007-1010 (1996).

Cornell, K. A., and Riscoe, M. K. Cloning and expression of *Escherichia coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: identification of the *pfs* gene product. *Biochim. Biophys. Acta.* **1396**, 8-14 (1998).

Dai, Y., Pochapsky, T. C., and Abeles, R. H. Mechanistic studies of two dioxygenases in the methionine salvage pathway of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry* **40**, 6379-6387 (2001).

Della, Ragione, F., Takabayashi, K., Mastropietro, S., Mercurio, C., Oliva, A., Russo, G. L., Della, Pietra, V., Borriello, A., Nobori, T., Carson, D. A., and Zappia, V. Purification and characterization of recombinant human 5'-methylthioadenosine phosphorylase: definite identification of coding cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 514-519 (1996).

Dische, Z., and Boresfbeund, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**, 583-587 (1951).

Dreyer, M. K., and Schulz, G. E. The spatial structure of the class II L-fuculose-1-phosphate aldolase from *Echerichia coli*, *J. Mol. Biol.* **231**, 549-553 (1993).

Feller, U., Anders, I., and Mae, T. Rubiscoytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J. Exp. Bot.* **59**, 1615-1624 (2008).

Fenn, T. D., Ringe, D., and Petsko, G. A. Xylose isomerase in substrate and inhibitor michaelis states: atomic resolution studies of a metal-mediated hydride shift *Biochemistry* **43**, 6464-6474 (2004).

Fessner, W. D., Schneider, A., Held, H., Sinerius, G., Walter, C., Hixon, M., and Schloss, J. V. The mechanism of class II, metal dependent aldolases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 2219-2221 (1996).

Finn, M. W., and Tabita, F. R. Synthesis of catalytically active form III ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in archaea. *J. Bacteriol.* **185**, 3049-59 (2003).

Furfine, E. S., and Abeles, R. H. Intermediates in the conversion of 5'-S-methylthioadenosine to methionine in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **263**, 9598-9606 (1988).

Grundy, F. J., and Henkin, T. M. The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **30**, 737-749 (1998).

Gupta, R. S. Evolutionary relationships among photosynthetic bacteria. *Photosynth Res.* **76**, 173-183 (2003).

Hanson, T. E., and Tabita, F. R. A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulphur



metabolism and the response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4397-4402 (2001).

Hartman, F. C., Milanez, S., and Lee, E. H. Ionization constants of two active-site lysyl epsilon-amino groups of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **260**, 13968-13975 (1985).

Hartman, F. C., and Harpel, M. R. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197-234 (1994).

Heilbronn, J., Wilson, J., and Berger, J. B. Tyrosine aminotransferase catalyzes the final step of methionine recycling in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**, 1739-1747 (1999).

Hixon, M., Sinerius, G., Schneider, A., Walter, C., Wolf-Dieter, F., and Schloss, J. V. Quo vadis photorespiration: a tale of two aldolases. *FEBS lett.* **392**, 281-284 (1996).

Horecker, B. L., Tsolas, O., and Lai, C. Y., in "The Enzymes", ed, Boyer, P. D., Academic Press, New York, pp. 213-258 (1972).

Hudson, G. S., Evans, J. R., Von Caemmerer S., Arvidsson, Y. B. C., and Andrews, T. J. Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* **98**, 294-302

(1992).

Imker, H. J., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Almo, S. C., and Gerlt, J. A. Mechanistic diversity in the RuBisCO superfamily: the "enolase" in the methionine salvage pathway in *Geobacillus kaustophilus*. *Biochemistry* **46**, 4077-4089 (2007).

Joerger, A. C., Mueller-Dieckmann, C., and Schulz G. E. Structures of L-fuculose-1-phosphate aldolase mutants outlining motions during catalysis. *J. Mol. Biol.* **303**, 531-543 (2000).

Johnson, A. E., and Tanner, M. E. Epimerization via carbon-carbon bond cleavage. L-Ribulose-5-phosphate 4-epimerase as a masked class II aldolase. *Biochemistry* **37**, 5746-5754 (1998).

Kroemer, M., Merkel, I., and Schulz, G. E. Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry* **42**, 10560-10568 (2003).

Lee, L. V., Vu, M. V. and Cleland, W. W. <sup>13</sup>C and deuterium isotope effects suggest an aldol cleavage mechanism for L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase. *Biochemistry* **39**, 4808-4820 (2000)a.

Lee, L. V., Poyner, R. R., Vu, M. V., and Cleland, W. W. Role of metal ions in the reaction catalyzed by L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase. *Biochemistry* **39**, 4821-4830 (2000)b.

Li, H., Sawaya, M. R., Tabita, F. R., and Eisenberg, D. Crystal structure of a RuBisCO-like protein from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Structure* **13**, 779-789 (2005).

Li, M., Suzuki, E. and Kurata, T. Effect of 2,3-diketo-L-gulonic acid on the oxidation of yolk lipoprotein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 599-604 (2001).

Lorimer, G. H., Badger, M. R., and Andrews, T. J. The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry* **15**, 529-536 (1976).

Lorimer, G. H. *Biochemistry* **20**, 1236-1240 (1981).

Luo, Y., Samuel, J., Mosimann, S. C., Lee, J. E., Tanner, M. E., and Strynadka, N. C. J. The structure of L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase: an aldolase-like platform for epimerization. *Biochemistry* **40**, 14763-14771 (2001).

Matsuda, Y., and Colman, B. A new screening method for algal photosynthetic mutants (CO<sub>2</sub>-insensitive mutants of the green alga *Chlorella ellipsoidea*). *Plant Physiol.* **110**, 1283-1291 (1996).

McCurry, S. D., and Tolbert, N. E. Inhibition of ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase by xylulose 1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **252**, 8344-8346 (1977).

Miziorko, H. M., and Lorimer, G. H. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 507-535 (1983).

Morita, N., Inoue, K., and Takagi, M. Quinoxalines derived from D-glucose and *o*-phenylenediamine in a weakly acidic medium. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2665-2668 (1981).

Mueller-Cajar, O., Morell, M., and Whitney, S. M. Directed evolution of rubisco in *Escherichia coli* reveals a specificity-determining hydrogen bond in the form II enzyme. *Biochemistry* **46**, 14067-14074 (2007).

Murphy, B. A., Grundy, F. J., and Henkin, T. M. Prediction of gene function in methylthioadenosine recycling from regulatory signals. *J. Bacteriol.* **184**, 2314-2318 (2002).

Negishi, T., Nakanishi, H., Yazaki, J., Kishimoto, N., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kikuchi, S., Mori, S., and Nishizawa, N. K. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.* **30**, 83-94 (2002).

Nishikawa, Y., Toyoshima, Y., and Kurata, T. Identification of 3, 4-dihydroxy-2-oxo-butanal (L-threosone) as an intermediate compound in oxidative degradation of dehydro-L-ascorbic acid and 2,3-diketo-L-gulonic acid in a deuterium oxide phosphate buffer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1707-1712 (2001).

O'Donoghue, A. C., Amyes, T. L., and Richard, J. P. Hydron transfer catalyzed by triosephosphate isomerase. Products of isomerization of (R)-glyceraldehyde 3-phosphate in D<sub>2</sub>O. *Biochemistry* **44**, 2610-2621 (2005)a.

O'Donoghue, A. C., Amyes, T. L., and Richard, J. P. Hydron transfer catalyzed by triosephosphate isomerase. Products of isomerization of dihydroxyacetone phosphate in D<sub>2</sub>O. *Biochemistry* **44**, 2622-2631 (2005)b.

Parry, M. A., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A., Madgwick, P. J., and Keys, A. J. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* **54**, 1321-1333 (2003).

Paulsen, J. M., and Lane, M. D. Spinach ribulose diphosphate carboxylase. I. Purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* **5**, 2350-2357 (1966).

Pierce, J., Tolbert, N. E., and Barker, R. Interaction of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase with transition-state analogues. *Biochemistry* **19**, 934-942 (1980).

Portis, A. R. Jr., and Parry, M. A. Discoveries in rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth. Res.* **94**, 121-143 (2007).

Proud, C. G. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 3-12 (2005).

Riscoe, M. K., Ferro, A. J., and Fitch, J. H. Analogs of 5-methylthioribose, a novel class of antiprotozoal agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **32**, 1904-1906 (1988).

Rose, I. A. Mechanism of the aldose-ketose isomerase reactions. *Adv. Enzymol.* **43**, 491-517 (1975).

Saito, Y., Ashida, H., Kojima, C., Tamura, H., Matsumura, H., Kai, Y., and Yokota, A., Enzymatic characterization of 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase from *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2021-2028 (2007).

Samuel, J., Luo, Y., Morgan, P. M., Strynadka, N. C. J., and Tanner, M. E. Catalysis and binding in L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase: a comparison with L-fuculose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry* **40**, 14772-14780 (2001).

Sandala, G. M., Smith, D. M., Coote, M. L., Golding, B. T., and Radom, L. Insights into the hydrogen-abstraction reactions of diol dehydratase: relevance to the catalytic mechanism and suicide inactivation. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3433-3444 (2006).

Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science* **315**, 1003-1006 (2007).

Saunders, C., Schmidt, B., Morot, M., Thompson, L., and Guyer, M. Use of chromosomal integration in the establishment and expression of bla<sub>Z</sub>, a *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamase gene, in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **157**, 718-726 (1984).

Sekowska, A., Mulard, L., Krogh, S., Tse, J. K., and Danchin, A. MtnK, methylthioribose kinase, is a starvation-induced protein in *Bacillus subtilis*. *B. M. C. Microbiol.* **1**, 15 (2001).

Sekowska, A., Dénervaud, V., Ashida, H., Michoud, K., Haas, D., Yokota, A., and Danchin, A. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *B. M. C. Microbiol.* **4**, 9 (2004).

Selesi, D., Schmid, M., and Hartmann, A. Diversity of green-like and red-like ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes (cbbL) in differently managed agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 175-184 (2005).

Smith, S. A., and Tabita, F. R. Positive and negative selection of mutant forms of prokaryotic (cyanobacterial) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Mol. Biol.* **331**, 557-569 (2003).

Tabita, F. R., Hanson, T. E., Li, H., Satagopan, S., Singh, J., and Chan, S. Function,

structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 576-99 (2007).

Tamura, H., Matsumura, H., Inoue, T., Ashida, H., Saito, Y., Yokota, A., and Kai, Y. Crystallization and preliminary X-ray analysis of methylthioribose-1-phosphate isomerase from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **61**, 595-598 (2005).

Tamura, H., Saito, Y., Ashida, H., Inoue, T., Kai, Y., Yokota, A., and Matsumura, H. Crystal structure of 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase product complex from *Bacillus subtilis*: implications for catalytic mechanism. *Protein Sci.* **17**, 126-135 (2008).

Taylor, T. C., and Andersson, I. The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **265**, 432-444 (1997).

Tcherkez, G.G., Farquhar, G. D., and Andrews, T. J. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7246-7251. (2006).

Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S., Yokota, A. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red algae with a strong specificity for CO<sub>2</sub> fixation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 568-571 (1997).

van der Wielen, P. W. Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase



large-subunit genes in the MgCl<sub>2</sub>-dominated deep hypersaline anoxic basin discovery. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 326-331 (2006).

Vislisel, J. M., Schafer, F. Q., and Buettner, G. R. A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. *Anal. Biochem.* **365**, 31-39 (2007).

von Caemmerer S., Millgate, A., Farquhar, G. D., and Furbank, R. T. Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by antisense RNA in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis* leads to reduced assimilation rates and increased carbon isotope discrimination. *Plant Physiol.* **113**, 469-477 (1997).

Wang, H., Pang, H., Bartlam, M., and Rao, Z. Crystal structure of human E1 enzyme and its complex with a substrate analog reveals the mechanism of its phosphatase/enolase activity. *J. Mol. Biol.* **348**, 917-926 (2005).

Watson, G. M., and Tabita, F. R. Unusual ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea. *J. Bacteriol.* **181**, 1569-75 (1999).

Webb, B. L., and Proud, C. G. Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1127-1131 (1997).

Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K., and Mori, S. Isolation and characterization of *IDI2*, a new Fe-deficiency-induced cDNA from barley roots, which encodes a protein related to the  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B $\alpha$ ). *J.*

*Exp. Bot.* **51**, 2001-2007 (2000).

Yang, W., and Hinnebusch, A. G. Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6603-6616 (1996).

Yokota, A. Carboxylation and detoxification of xylulose bisphosphate by spinach ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Physiol.* **32**, 755-762 (1991).

Yokota, A., and Kitaoka, S. Correct pK values for dissociation constant of carbonic acid lower the reported Km values of ribulose bisphosphate carboxylase to half. Presentation of a nomograph and an equation for determining the pK values. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 1075-1079 (1985).

## 論文目録

- 1 . Ashida, H.,\* **Saito, Y.**, \* Kojima, C., and Yokota, A. \* Authors contributed equally.  
Enzymatic Characterization of 5-Methylthioribulose-1-phosphate Dehydratase of the Methionine Salvage Pathway from *Bacillus subtilis*.  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.* , **72**, 959-967, (2008).
- 2 . Tamura, H., **Saito, Y.**, Ashida, H., Inoue, T., Kai, Y., Yokota, A., and Matsumura, H.  
Crystal structure of 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase product complex from *Bacillus subtilis*: Implications for catalytic mechanism.  
*Protein Sci.* **17**, 126-135, (2008).
- 3 . **Saito, Y.**, Ashida, H., Kojima, C., Tamura, H., Matsumura, H., Kai, Y., and Yokota, A.  
Enzymatic Characterization of 5-Methylthioribose 1-Phosphate Isomerase from *Bacillus subtilis*.  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2021-2028 (2007).
- 4 . Carre-Mlouka, A., Mejean, A., Quillardet, P., Ashida, H., **Saito, Y.**, Yokota, A., Callebaut, I., Sekowska, A., Dittmann, E., Bouchier, C., and de Marsac, N., T.  
A new rubisco-like protein coexists with a photosynthetic rubisco in the planktonic cyanobacteria *Microcystis*.  
*J. Biol. Chem.*, **281**, 24462-24471 (2006).
- 5 . Tamura, H., Matsumura, H., Inoue, T., Ashida, H., **Saito, Y.**, Yokota, A., and Kai, Y.  
Crystallization and preliminary X-ray analysis of methylthioribose-1-phosphate isomerase from *Bacillus subtilis*.  
*Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **61**, 595-598 (2005).
- 6 . Ashida, H., **Saito, Y.**, Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Yokota, A.  
A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO.  
*Science*, **302**, 286-290 (2003).