97 自然界における代謝効率化機構の解明と応用

東京大学 大学院薬学系研究科 薬科学専攻 天然物化学教室　　森　貴裕

生物内のさまざまな代謝経路において、酵素自己集合現象により代謝酵素間で相互作用し、細胞内で一過性の特異的な巨大自己集合体、「メタボロン」を形成することが提唱されている。メタボロンを形成することで、生合成関連酵素を局在化させ、チャネリング効果による基質受け渡しの効率化、不安定中間体の分解の抑制など、生合成反応の効率化が行われているとされている。本研究では、微生物、植物、動物等由来ポリアミン生合成酵素群をモデルとして取り上げ、酵素ー酵素間相互作用解析、X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析による酵素複合体構造の解明を行った。

ポリアミンは低分子の正電荷した脂肪族炭化水素の総称で、全ての生物に普遍的に存在している。最も一般的なポリアミンは、プトレシン、カダベリン、スペルミジン、スペルミンである（図 1）。これらのポリアミンは、細胞分裂や DNA の複製のような細胞内の過程やストレス反応などにおいて重要な役割を果たしている。これらポリアミン生合成は生物間で共通した経路を有しており、オルニチンがオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）により脱炭酸し、プトレシンが生成したのちに、スペルミジン合成酵素（SPDS）が S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素（SAMDC）によって、生成した脱炭酸型 S-アデノシルメチオニン（SAM）とプトレシンを縮合することによりスペルミジンが、スペルミン合成酵素（SPMS）によって脱炭酸型 SAM とスペルミジンが縮合しスペルミンが生成する。本研究では、ヒト、植物、酵母における酵素ー酵素間相互作用解析とメタボロンの構造解明を行うことで、ポリアミン生合成の代謝効率化機構の詳細や生物種間での一般性、相違性を明らかとすることを目的とした。

ヒト由来 SPDS、SPMS、SAMDC と植物シロイヌナズナ由来 SPDS、SPMS、SAMDC に対して yeast two hybrid assay を用いて細胞内における相互作用の解析を行った。酵素の組み合わせを変えて相互作用を検出した結果、過去の文献で相互作用が見出されていたシロイヌナズナ由来SPDS とSPMSについて相互作用を確認した。興味深いことに、ヒト由来 SPMS とシロイヌナズナ由来 SPDS においても相互作用が検出された。ヒトと植物 SPDS は 50%程度の相同性を示していることから、相互作用には保存されている部分構造が重要であることが示唆される。一方、相互作用しうるシロイヌナズナ由来 SPDS 同士や SPMS 同士、または逆の組み合わせであるヒト由来 SPDS とシロイヌナズナ由来 SPMS では相互作用が検出できなかったことから、yeast two hybrid assay において、酵素複合体の核移行に難点があることが示唆された。

また、これまでに SPDS のホモダイマーや SPMS のホモダイマーの構造は報告されているものの、SPDS と SPMS ヘテロダイマーの構造は未解明であったため、ヘテロダイマーの構造解析も行った。シロイヌナズナ由来 SPDS に His タグ、シロイヌナズナ由来 SPMS に MBP タグを付加して共発現し、Ni-NTA カラムおよびアミロースカラムで多段階のアフィニティ精製、陰イオン交換カラム精製、ゲル濾過精製を行うことで、複合体酵素を単離した。精製した酵素複合体をクライオ電子顕微鏡にて解析した結果、低分解能ながら全体構造の 3 次元電子密度マップを取得した。SPMS ホモダイマーと比較したところ、その全体像は類似しており、ヘテロダイマーの相互作用はホモダイマー化と競合することが示唆された。実際、等温滴定型カロリメトリーを用いた分子間相互作用解析を行ったところ、それぞれ独立に精製したのちに滴定を行った場合には、非常に弱い相互作用しか検出されず、共発現時にヘテロダイマーを形成することが代謝効率化に重要であることが示唆された。現在、分解能向上を目的に測定条件の最適化および、精製酵素を用いた FRET による相互作用検出、cross-linking MS による相互作用部位の解析を行なっているところである。

【発表】本助成金での成果発表があれば、以下の例にならい記載する。

1)　2024 年 3 月　薬学会、口頭発表

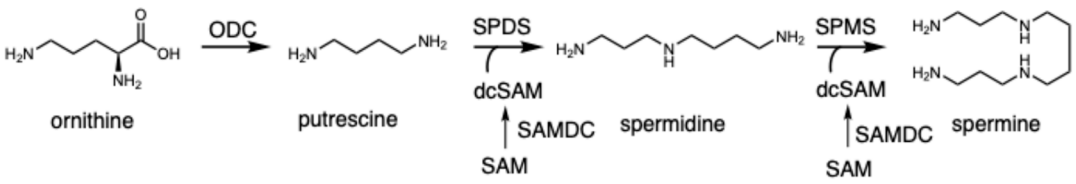


図 1. ポリアミンの生合成経路