

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 中澤 昌美
学位授与の日付	平成23年2月20日
論文名	Biochemical studies on unique enzymes of carbohydrate metabolism in mitochondria of <i>Euglena gracilis</i> (ユーグレナミトコンドリアの炭素代謝系を構成するユニークな酵素に関する生化学的研究)
論文審査委員	主査 宮武 和孝 副査 乾 博 副査 川口 剛司

## 論文要旨

### 1. 背景

ユーグレナは、植物・動物の両方に分類される生物である。その代謝系にも両特徴を併せもつが、加えてミトコンドリアに非常にユニークな代謝系をもつことを我々は報告してきた。系統学的には、ユーグレナは真核生物の誕生から比較的初期に分岐した生物であり、真核生物のミトコンドリア進化を考察するために非常に重要な位置付けにある。また、ユーグレナのもつ特異な酵素の性質解明は、ユーグレナおよび他の生物の炭素代謝を改変するツールの開発につながる。これらの観点から本論文では、ユーグレナのミトコンドリアに特異な酵素の中で、ピルビン酸の酸化的脱炭酸を触媒するピルビン酸： $\text{NADP}^+$ 酸化還元酵素、および二機能型グリオキシル酸経路酵素について酵素学的解析および系統学的解析を行った。

### 2. ピルビン酸： $\text{NADP}^+$ 酸化還元酵素のクローニングおよび系統解析

一般の真核生物では、ピルビン酸からアセチル-CoA への変換はピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC) によって  $\text{NAD}^+$  を電子受容体として行われる。しかし、ユーグレナでは PDC 活性は検出されず、酸素感受性のピルビン酸： $\text{NADP}^+$ 酸化還元酵素 (PNO) が機能していることが見だされてきた。そこで本研究では、PNO の cDNA クローニングと系統解析を行い、ピルビン酸の酸化的脱炭酸反応の進化を考察した。

全長 cDNA クローニングおよび解析の結果、PNO タンパク質はミトコンドリア移行シグ

ナルを有し、酵素の N 末端側にはピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素（PFO）と相同性を示すドメインが存在した。PFO は主に嫌気性細菌やミトコンドリアを持たない真核生物において、鉄-硫黄クラスター依存のピルビン酸脱炭酸を行う酵素ファミリーである。サブユニット構成の異なる複数のサブファミリーが存在するが、PNO はミトコンドリアを持たない原生動物および真性細菌、ラン藻に存在するホモダイマー型との相同性が最も高く、50%程度の相同性を示した。C 末端側のドメインは、哺乳類の NADPH-シトクロム P450 還元酵素（CPR; 約 30%）や細菌の NADPH-亜硫酸還元酵素  $\alpha$  サブユニット（SiR $\alpha$ ; 約 20%）と相同性を示した。以上のことから、ユーグレナ PNO はホモダイマー型 PFO と、CPR や SiR $\alpha$  と同一起源を持つフラビン酵素とが遺伝子融合することによって成立し、このことによって電子受容体としてフェレドキシンを用いる酵素から NADP<sup>+</sup> を利用できる酵素への進化が成立したと結論した。また PNO がミトコンドリアに存在するという事実と、ミトコンドリアを持たない原生動物の水素産生を担うヒドロゲノソームに局在する PFO と PNO が共通起源を持つという系統解析の結果は、真核生物のミトコンドリアの起源を考察する上で非常に重要な証拠となった。

### 3. ピルビン酸：NADP<sup>+</sup>酸化還元酵素の補酵素型チアミンによる安定化について

ユーグレナは生育にビタミン B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>) を要求する。B<sub>1</sub> の補酵素型、チアミンピロリン酸 (TPP) を有するピルビン酸：NADP<sup>+</sup>酸化還元酵素 (PNO) が B<sub>1</sub> 欠乏細胞内で受ける制御について各種生化学的手法により解析した。

B<sub>1</sub> 欠乏細胞では、PNO の活性が約 10%程度にまで低下しており、そのほとんどが TPP を持たないアポ型であった。このとき、PNO タンパク質量も大きく低下していたが、PNO mRNA 量はほとんど変化していなかった。B<sub>1</sub> 欠乏細胞に B<sub>1</sub> を添加すると PNO 活性およびタンパク質量が急激に上昇したが、このときも PNO mRNA はほとんど変化しなかった。これらの結果より、B<sub>1</sub> による PNO の調節は mRNA 合成を伴わない、転写後レベルで行われることが示唆された。B<sub>1</sub> 欠乏細胞にタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を添加すると、PNO 活性・タンパク質量が 12 時間後には 30%程度にまで低下した。しかし、B<sub>1</sub> 欠乏細胞に CHX 処理した 1 時間後に、培地に B<sub>1</sub> を添加すると、B<sub>1</sub> 添加後は経時的な PNO 活性の低下が抑制された。他の解析結果と併せると、細胞内で PNO タンパク質は常に合成されているが、補酵素を持たないアポ型 PNO が不安定で、ミトコンドリア内で素早く分解されること、さらに、アポ型 PNO は補酵素 TPP を得ることで安定化されることが示唆された。TPP による coenzyme stabilization は報告が無く、ビタミンとしての B<sub>1</sub> の新たな機能を見出した。

### 4. 二機能型グリオキシル酸経路酵素ーリンゴ酸シンターゼ/イソクエン酸リアーゼの発見とクローニング

微生物や植物は C<sub>2</sub> 化合物や脂質を炭素源として生育する際に、TCA 回路のバイパス経路であるグリオキシル酸経路の酵素活性を誘導する。この経路はイソクエン酸をコハク酸とグリオキシル酸に開裂するイソクエン酸リアーゼ (ICL) と、グリオキシル酸とアセチル-CoA からリンゴ酸を合成するリンゴ酸シンターゼ (MS) の 2 つの酵素で構成されている。ユーグレナも C<sub>2</sub> 化合物を炭素源として生育することができ、ICL および MS の酵素活性を持つことが知られていたが詳細は不明であった。本研究ではユーグレナグリオキシル酸経路の構成酵素の精製とクローニングを行った。

ICL 活性を指標にユーグレナから精製した酵素は、同時に MS 活性を有していた。精製酵素の分子量は既知の ICL および MS の分子量の和にほぼ等しく、本酵素が両活性ドメインをあわせもつ二機能型酵素であることが示唆された。

精製酵素をプロテアーゼで部分切断したペプチドの N 末端配列情報を活用したスクリーニングによって全長 cDNA を獲得した。推定アミノ酸配列の解析から、本酵素タンパク質には N 末端側に MS と相同性の高いドメインが、C 末端側に ICL と相同性を示すドメインが存在し、両者がリンカーを介して結合していることが明らかとなった。二機能型グリオキシル酸経路酵素として既に報告されていた線虫の酵素と比較すると、ポリペプチド内のドメイン構造が逆向きであった。ユーグレナと線虫の両酵素の進化的起源も大きく異なることから、これらの祖先遺伝子における遺伝子融合が、異なるイベントとして起こったことが明らかとなった。

## 5. 組換えタンパク質を用いた二機能型グリオキシル酸経路酵素の機能解析

ユーグレナの二機能型グリオキシル酸経路酵素 (EgGCE) の大腸菌リコンビナント酵素を作製し種々の酵素学的性質を解析した。

推定ミトコンドリア移行シグナルを切断した成熟型組換え EgGCE は、ユーグレナから精製したものと同様の酵素学的性質を有していた。酵素 N 末端側のリンゴ酸シンターゼ (MS) と相同性の高いドメインのみを発現させた組換え酵素は、成熟型組換え EgGCE とほぼ同様の MS 活性を示した。しかし、C 末端側のイソクエン酸リアーゼ (ICL) と相同性を有するドメインは、単独では ICL 活性を示さなかった。ICL 活性を示す最小領域を決定するために各種欠失変異体を作製・解析した結果、20 から 37 番目のアミノ酸残基が ICL 活性に加えて MS 活性にも重要であると示唆された。

EgGCE には、ICL 活性が、MS 反応の基質アセチル-CoA により上昇する、という独自の特徴がある。この調節のメカニズムを解明するために、変異体を作製し解析した。MS ドメインの推定アセチル-CoA 結合部位に変異を導入した 2 種の変異酵素は完全に MS 活性を失っており、アセチル-CoA に対する親和性低下が示唆された。アセチル-CoA による ICL 活性の速度論パラメータ変化を比較したところ、野生型と変異型酵素にほとんど差がなかった。よって、アセチル-CoA による ICL 活性の調節には、MS ドメインのアセチル-CoA 結合領域と異なる領域が関与していることが示唆された。さらに、変異体を用いて ICL の逆反応である、グリオキシル酸とコハク酸の縮合によるイソクエン酸合成の活性に及ぼすアセチル-CoA の影響を検討した。その結果、アセチル-CoA 存在下で酵素のコハク酸との親和性が大きく上昇した。アセチル-CoA による ICL 調節は、グリオキシル酸を消去する MS 反応に必要なアセチル-CoA が存在するときのみ、グリオキシル酸遊離反応である ICL の活性が上昇する、という生理的状況に対応する。TCA 回路の強力な阻害剤であるグリオキシル酸を産生する経路がミトコンドリアに存在するために、アセチル-CoA による EgGCE の調節が非常に有効であるというモデルを提唱し、その生理的な意義を明確にした。

## 6. 総括

本論文では、ユーグレナミトコンドリアに存在する、2 つのユニークな融合酵素について系統学および生化学的解析を行い、以下のことを明らかにした。まず、ピルビン酸:NADP<sup>+</sup>酸化還元酵素は、フラビン酵素をモジュールとして組み込むことで、新たな電子受容体を利用するという酵素進化を遂げたことを明らかにした。そして、二機能型グリオキシル酸経路酵素では、連続した 2 つの酵素反応を触媒する酵素を進化の過程で融合し、巧妙に調節することで有害な中間代謝産物の放出を抑え、ミトコンドリアへの局在を可能にしたという生理的意義を見出した。これらの知見は、酵素の直接的な利用に留まらず、人工的な融合酵素の設計という新たな分野への応用も期待できると考察した。

## 審査結果の要旨

ユーグレナは、植物・動物の両方に分類される生物で、その代謝系にも両特徴を有し、加えてミトコンドリアにユニークな代謝系の存在の報告がある。本生物の持つ特異な代謝系酵素の性質解明は、真核生物のミトコンドリア進化過程の解明だけでなく、ユーグレナおよび他の生物の炭素代謝を改変するツールの応用開発に繋がることが期待される。

これらの観点から本研究では、ユーグレナのミトコンドリアに存在する特異な酵素、ピルビン酸の酸化脱炭酸を触媒するピルビン酸： $\text{NADP}^+$ 酸化還元酵素、および二機能型グリオキシル酸経路酵素について酵素学的解析および系統学的解析を行なうことで目的を達成しようとした。

最初に一般の真核生物には存在しないピルビン酸： $\text{NADP}^+$ 酸化還元酵素 (PNO) のクローニングおよび系統解析を行なった。全長 cDNA クローニングおよび解析の結果、PNO タンパク質はミトコンドリア移行シグナルを有し、酵素の N 末端側にはピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (PFO) と相同性を示すドメインが存在していた。ユーグレナ PNO はホモダイマー型 PFO と、哺乳類の  $\text{NADPH}$ -シトクロム P450 還元酵素 (CPR) や細菌の  $\text{NADPH}$ -亜硫酸還元酵素  $\alpha$  サブユニット (SiR $\alpha$ ) と同一起源を持つフラビン酵素とが遺伝子融合し、電子受容体としてフェレドキシンを用いる酵素から  $\text{NADP}^+$  を利用できる酵素への進化をしたと結論した。さらに、PNO がミトコンドリアに存在すること、ミトコンドリアを持たない原生動物の水素産生を担うヒドロゲノソームに局在する PFO と PNO が共通起源を持つという系統解析から、真核生物のミトコンドリアの起源解明上で非常に重要な証拠を提供した。続いてこの生物の生育必須因子による本酵素の活性調節、安定化について検討した。ユーグレナは生育にビタミン  $\text{B}_1$  ( $\text{B}_1$ ) を要求するが、 $\text{B}_1$  欠乏細胞では、PNO の活性が約 10%まで低下し、補酵素 (TPP) を持たないアポ型で存在することから、細胞内で PNO タンパク質は常に合成されているが、補酵素を持たないアポ型 PNO が不安定で、ミトコンドリア内で分解されること、さらに、アポ型 PNO は補酵素 TPP を得ることで安定化されることを見出した。TPP による coenzyme stabilization は新規のものであり、ビタミンとしての  $\text{B}_1$  の新たな機能として報告した。

次に、二機能型グリオキシル酸経路酵素—リンゴ酸シンターゼ/イソクエン酸リアーゼの精製とクローニングを行なった。ICL 活性を指標にユーグレナから精製した酵素は、同時に MS 活性を有し、精製酵素の分子量は既知の ICL および MS の分子量の和にほぼ等しく、本酵素が両活性ドメインをあわせもつ二機能型酵素であると結論した。この確認のため、全長 cDNA を獲得し、推定アミノ酸配列の解析から、本酵素タンパク質には N 末端側に MS と相同性の高いドメインが、C 末端側に ICL と相同性を示すドメインが存在し、両者がリンカーを介して結合していることが明らかになった。線虫の酵素と比較し、ポリペプチド内でのドメイン構造が逆向きであり、ユーグレナと線虫の両酵素の進化的起源も大きく異なることから、これらの祖先遺伝子における遺伝子融合が、異なるイベント(水平遺伝)として起こったことを明らかにした。最後に、組換えタンパク質を用いた二機能型グリオキシル酸経路酵素の機能解析を行った。成熟型組換え酵素 (EgGCE) は、精製ユーグレナ酵素同様の酵素学的性質を有し、また酵素 N 末端側のリンゴ酸シンターゼ (MS) と相同性の高いドメインのみを発現させた組換え酵素は、組換え EgGCE とほぼ同様の MS 活性を示した。しかし、C 末端側のイソクエン酸リアーゼ (ICL) と相同性を有するドメインは、単独では ICL 活性を持たないことから、20 から 37 番目のアミノ酸残基が ICL 活性に加えて MS 活性にも重要であると推論した。

さらに、本酵素活性に及ぼすアセチル-CoA による活性化機構を、アセチル-CoA 結合部位改変体酵素を用いて解析した。MS ドメインのアセチル-CoA 結合部位に変異を導入すると完全に MS 活性を失い、アセチル-CoA による ICL 活性の速度論パラメータ変化を比較したところ、野生型と変異型酵素にほとんど差が見られず、アセチル-CoA による ICL 活性の調節には、MS ドメインのアセチル-CoA 結合領域と異なる領域が関与していると結論した。アセチル-CoA による ICL 調節は、グリオキシル酸を消去する MS 反応に必要なアセチル-CoA が存在するときのみ、グリオキシル酸遊離反応である ICL の活性が上昇する、という生理的状況に対応すると考えられ、TCA 回路の強力な阻害剤であるグリオキシル酸を産生する経路がミトコンドリアに存在するために、アセチル-CoA による本酵素の調節が非常に有効であるというモデルを提唱し、その生理的な意義を明確にした。

以上、本研究では、ユーグレナミトコンドリアに存在する、2つのユニークな酵素について系統学および生化学的解析を行い、酵素進化、ビタミンの酵素安定化、代謝物による酵素活性調節機能を明らかにした。これらの成果は、生化学、分子生物学、応用酵素科学、代謝調節学などに多大の貢献をするものであり、学力確認の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。