

95. 放線菌における新規メチオニン生合成経路の探索

長谷部 文人

福井県立大学 生物資源学部 生物資源学科 応用微生物学分野

Key words : メチオニン, 生合成, 放線菌, 硫黄キャリアタンパク質, PLP 酵素

緒言

メチオニンは含硫アミノ酸の1つであり、タンパク質の合成反応の最初に使われる生育に必須なアミノ酸である。このアミノ酸はタンパク質の合成だけでなく、メチル基供与体として一次代謝産物のみならず二次代謝産物の生合成に広く用いられる *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) の合成にも基質として利用される。SAM はメチル化反応の基質として多用され、代謝産物の構造多様性の創出にも重要な役割を果たしている。それゆえ、メチオニン生合成に関する新たな知見は、メチオニンや SAM、これらを基質として利用する化合物の発酵生産や抗菌剤開発の重要な基盤となる。

一般的な細菌のメチオニン生合成において (図 1)、L-aspartic acid から 3 段階の酵素反応によって生合成される L-homoserine (1) は、互いに配列相同性を持たない MetA や MetX という酵素により水酸基のアシル化を受け、*O*-acetyl-L-homoserine (4) または *O*-succinyl-L-homoserine (5) が生成する。これらは、cystathionine gamma synthase や cystathionine beta lyase といった酵素により L-homocysteine (2) に変換された後にメチオニンへと変換される [1]。一部の菌は、MetX の活性制御に MetW という制御タンパク質が必要である [2]。植物では *O*-acyl-L-homoserine ではなく threonine 生合成中間体でもある *O*-phospho-L-homoserine (3) を経由してメチオニンは生合成される。またメタン古細菌では 1 を経由せずに 2 を生合成する経路も報告され、メチオニン生合成経路には多様性が存在する。

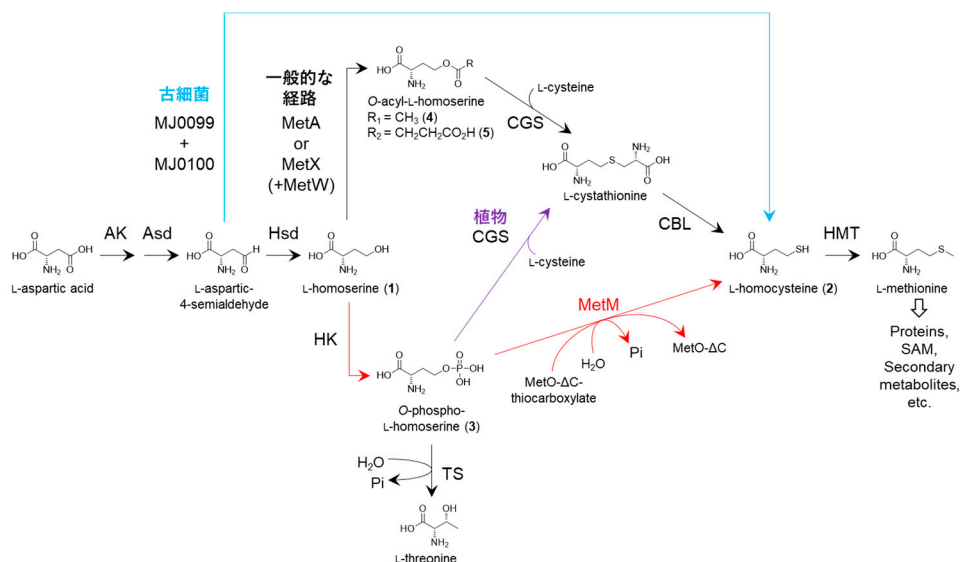


図 1. メチオニン生合成経路

黒線は一般的な経路。赤線は放線菌における新規経路。青線は古細菌における経路。紫線は植物における経路。「MetO- Δ C」は MetO の C 末端システイン残基の欠損体を、「MetO- Δ C-thiocarboxylate」は MetO- Δ C の C 末端のチオカルボン酸化体を示す。

Streptomyces 属放線菌は、土壤中に豊富に存在するグラム陽性の細菌であり、Avermectin、Streptomycin、Altemicidin 等の抗生物質を含む様々な二次代謝産物を生産する産業上重要な菌である。二次代謝産物の生合成において、SAM はメチル基供与体や骨格形成の基質として利用されることから、放線菌におけるメチオニンの生合成研究は多様な二次代謝産物の生産に重要な知見を与える。これまでに、多くの *Streptomyces* 属放線菌のゲノムが解読されており、その遺伝子情報を解析すると、一般的なメチオニン生合成に利用される *metA* や *metX* 遺伝子を欠く菌が多く存在していた。抗生物質である ϵ -poly-L-lysine を生産する放線菌 *Streptomyces albulus* NBRC14147 のゲノム情報の解析により、この菌は *metA* や *metX* 遺伝子だけでなく、植物型やメタン古細菌型の生合成遺伝子も欠くことから、新規なメチオニン生合成経路を有することが期待された。

これまでに我々は、*S. albulus* NBRC14147 の遺伝子情報を解析することで、上流に SAM リボスイッチと推測される遺伝子領域を有し、下流に thiamine や L-cysteine などの生合成に関与する Sulfur-carrier protein (SCP) と機能予測されるタンパク質をコードする遺伝子 (以降 *metO*) を有する遺伝子 (以降 *metM*) を見出し、このクラスターが *Streptomyces* 属に高度に保存されていることを見出した。そこで本研究では、それらに着目し、破壊株の栄養要求性確認や組換え酵素を用いた酵素機能の同定を行うことで、放線菌における新規なメチオニン生合成の解明を目指した。その結果、*metM* の破壊株はメチオニンの要求性を示すこと、MetM は 3 と MetO に由来するチオカルボン酸化された SCP から 2 を合成する酵素であることを明らかにした (図 1)。

方法および結果

1. 遺伝子破壊株を用いたメチオニン生合成経路の検証

S. albulus のメチオニン生合成経路を検証するために、homoserine dehydrogenase をコードする *hsd* と homoserine kinase をコードする *hk* と *metM* の各種破壊株 (Δhsd 、 Δhk 、 $\Delta metM$) をそれぞれ作製し、それら破壊株を各種アミノ酸 (threonine、メチオニン、1、2) を添加・非添加した M9 培地で培養を行った。その結果、 Δhsd だけでなく Δhk も threonine とメチオニンの要求性を示し、 $\Delta metM$ はメチオニンの要求性を示した (図 2)。また $\Delta metM$ の生育は 1 の添加では回復せず、2 の添加で回復した。したがって、*S. albulus* のメチオニン生合成にはこれらの遺伝子が必須であり、*hk* がコードする homoserine kinase は 1 から 3 を生成することから、*metM* は 3 から 2 への変換に関与することが明らかになった。

| | | strains | | | |
|-------------------------------------|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | "wt" | Δhsd | Δhk | $\Delta metM$ |
| Spore ($5.0 \times 10^{6 \pm X}$) | | X= 0, -1, -2, -3 | X= 0, -1, -2, -3 | X= 0, -1, -2, -3 | X= 0, -1, -2, -3 |
| Medium | | | | | |
| | M9 | | | | |
| | +Thr | | | | |
| | +Met | | | | |
| | +Thr+Met | | | | |
| | +1 | | | | |
| | +2 | | | | |

図 2. 各破壊株の生育試験

28℃で 72 時間培養後の写真。“wt”は各破壊株の親株である *S. albulus* を示す。

2. MetO の翻訳後修飾

MetM が 2 への変換に関与する場合、硫黄原子が反応に必要である。*metM* の下流には、その C 末端のアミノ酸配列が 90-GGC-92 である SCP をコードする *metO* があることから、これが翻訳後修飾により硫黄の供与体へと変換されたのちに MetM の反応に利用される可能性が考えられた。一般的な SCP は、その C 末端にある『GG』配列の C 末端側の glycine 残基がチオカルボン酸化され、硫黄の供与体として利用される。例えば、結核菌の cysteine 生合成では、SCP である CysO が MoeZ によりチオカルボン酸化され、これと *O*-phospho-L-serine を CysM が縮合することで CysO の C 末端に cysteine 残基が付加される。生成した CysO の C 末端 (92-GGC-94) は Mec により加水分解酵素され、cysteine が放出される [3]。*S. albulus* は *mec* と *moeZ* のホモログを有することから、Mec により MetO の C 末端が加水分解されて MetO- Δ C (MetO の C 末端配列が 90-GG-91) が生成し、これを MoeZ がチオカルボン酸化して MetO- Δ C-thiocarboxylate を生成すると考えられた (図 3a)。そこで、Mec が MetO の C 末端を加水分解できるのか検証するために、MetO と Mec の組換え体を作製し、それらを反応させた。反応溶液の LC-MS 分析の結果、Mec 存在下において MetO- Δ C の生成が確認された (図 3b)。

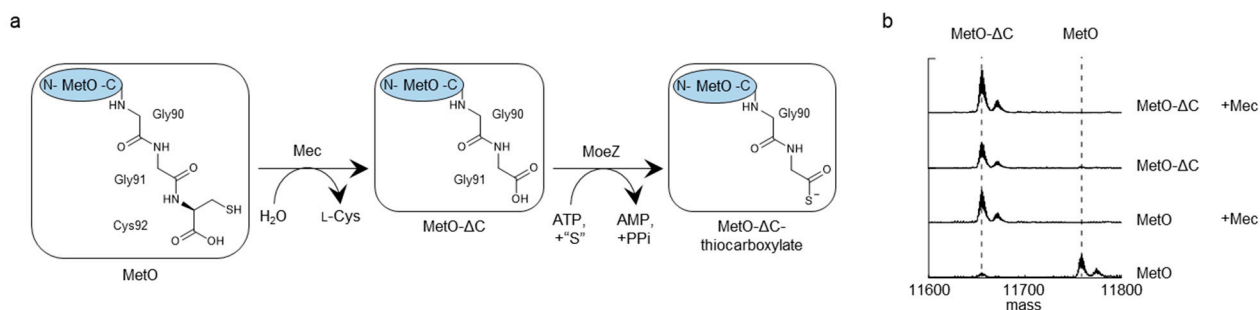


図 3. MetO の翻訳後修飾

- S. albulus* における Mec と MoeZ による MetO の推定変換経路。
- MetO/MetO- Δ C と Mec との反応溶液の LC-MS 分析。

3. MetM と MetO の相互作用

MetO- Δ C と MetO- Δ C-thiocarboxylate は、その C 末端がカルボキシル基またはチオカルボキシル基の違いだけであることから、MetO- Δ C が MetM と相互作用すれば MetO- Δ C-thiocarboxylate も MetM と相互作用すると考えられた。そこで、それぞれ Strep-tag と His-tag を付加した組換え MetO- Δ C と MetM を単独／共発現させ、これを Strep-tactin カラムに供してプルダウンアッセイを行った。各精製画分の SDS-PAGE の結果、MetO- Δ C と MetM を共発現させた時のみ、MetO- Δ C と共に MetM が溶出画分に確認され、これらの相互作用が明らかになった (図 4)。

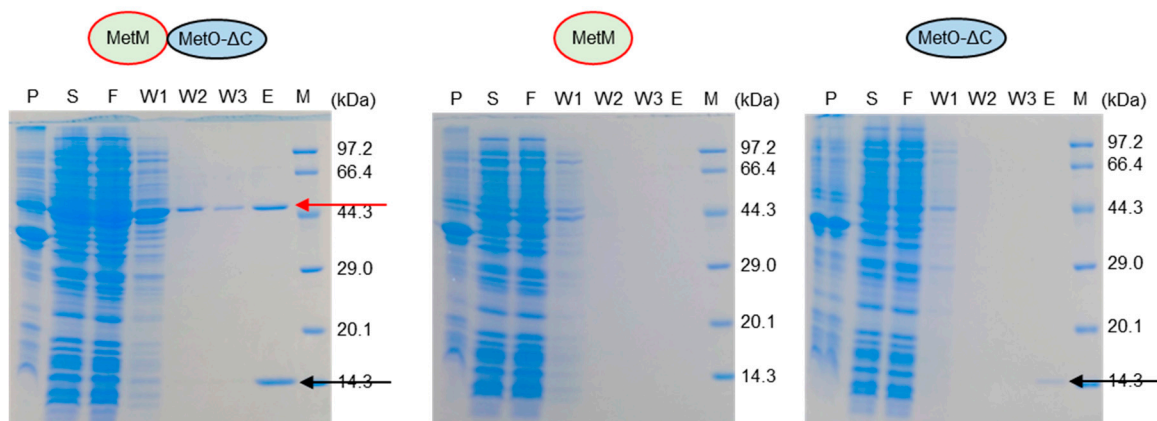


図 4. MetO- Δ C と MetM のプルダウンアッセイ

左図：MetO- Δ C と MetM の共発現、中央図：MetM の単独発現、右図：MetO の単独発現。

M：分子量マーカー、P：菌体破碎後の遠心後の沈殿画分、S：菌体破碎後の遠心後の上清画分、

F：flowthrough 画分、W1~3：wash 画分、E：溶出画分。

4. MetM の機能解析

MetM の機能を明らかにするために、基質候補 (**1**、**3**、**4**、**5**) と Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag (IMPACT) system を用いて調製した MetO- Δ C-thiocarboxylate を硫黄供与体として混合し、反応を行った。反応溶液の LC-MS 分析の結果、MetM と **3** と MetO- Δ C-thiocarboxylate を混合した時のみ、MetO- Δ C-thiocarboxylate に相当するデコンボリューションピークの減少と MetO- Δ C に相当するデコンボリューションピークの増加が示唆され (図 5a)、**2** の生成が確認された (図 5b)。また、マーフィー試薬を用いて反応産物を修飾し、LC-MS で分析したところ、これは L 体であった (図 5c)。したがって、MetM は **3** と MetO- Δ C-thiocarboxylate から L 体の **2** を合成する酵素であることが明らかになった。

さらに MetM の反応機構を推定するために、MetO- Δ C-thiocarboxylate における C 末端側のケト基をメチレン基に置換したアナログ MetO-G90-cysteamine を IMPACT system を用いて作製し、これと MetM と **3** を混合して反応を行った。LC-MS 分析により、MetO-G90-cysteamine と **3** が脱リン酸化を伴って生じると考えられる縮合体に相当するデコンボリューションピークが確認された (図 5d)。この結果と MetM が PLP 酵素である threonine synthase と相同性を示すことから、図 5e に示す反応機構が推定された。

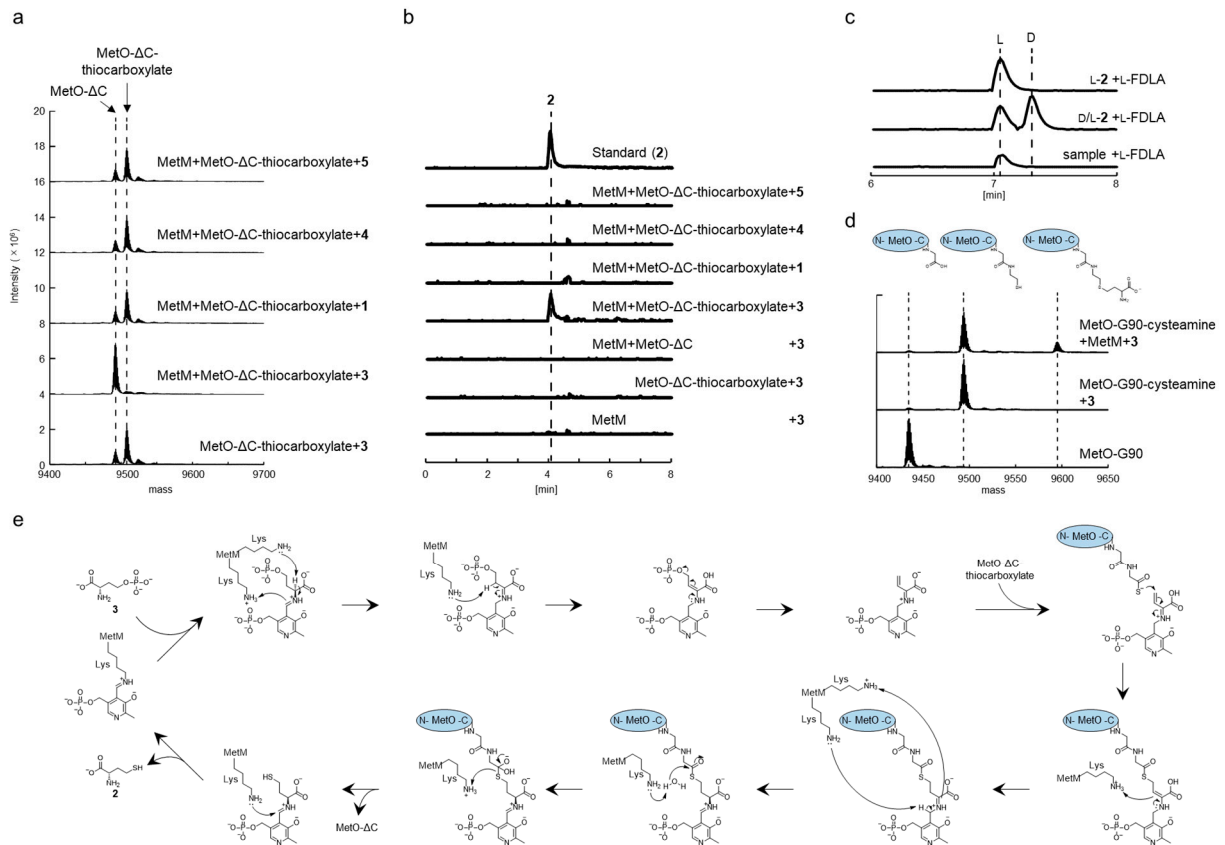


図 5. MetM を用いた反応溶液の LC-MS 分析

- MetO- Δ C-thiocarboxylate を用いた条件の Deconvoluted mass spectra。
- Extracted ion chromatograms (m/z 136.0427 ± 0.0020 $[M+H]^+$)。
- マーフィー試薬で修飾したサンプルの LC-MS 分析。Extracted ion chromatograms (m/z 724.2355 ± 0.0020 $[M+H]^+$)。
- MetO-G90-cysteamine を用いた条件の Deconvoluted mass spectra。
- MetM の推定反応機構。

考 察

本研究により、放線菌 *S. albulus* において *metM* はメチオニン生合成に必須な遺伝子であることが明らかになった。ゲノムが公開されている 550 菌株の *Streptomyces* 属放線菌について、MetM ホモログの有無を調べたところ、全ての菌が MetM ホモログを有し、その相同性は 77% 以上であった。また、BLAST 検索や系統樹解析によりその分布を調べた結果、Euryarchaeota や Thaumarchaeota に属する古細菌や、Actinomycetota、Cyanobacteria、Acidobacteriota、Nitrospirota や Aquificota に属する細菌が MetM ホモログをコードする遺伝子を有しており、多くの微生物がこの MetM ホモログを利用してメチオニンを生合成している可能性が示唆された (図 6)。

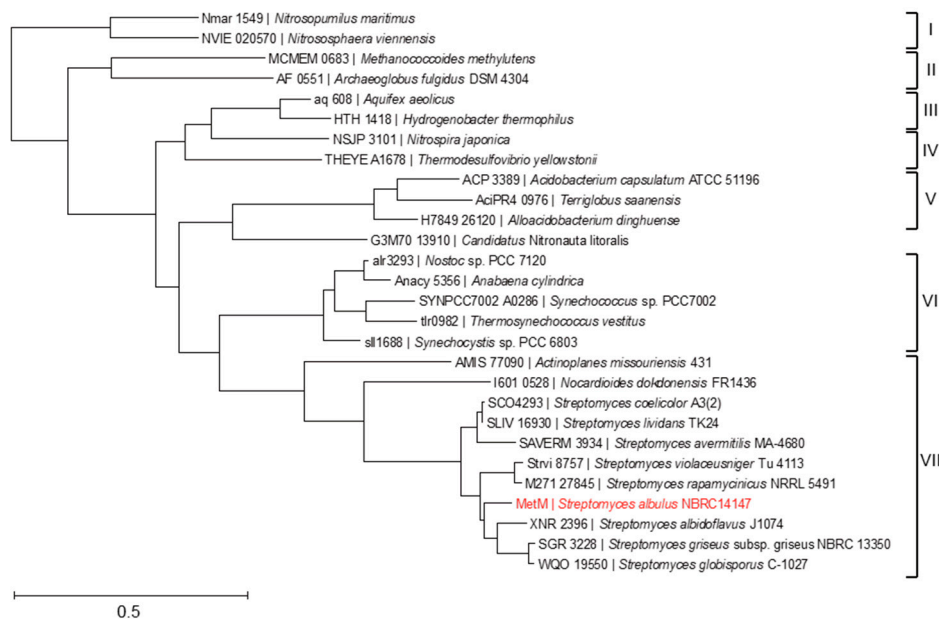


図 6. MetM の系統樹解析

I : Thaumarchaeota、II : Euryarchaeota、III : Aquificota、IV : Nitrospirota、
V : Acidobacteriota、VI : Cyanobacteria、VII : Actinomycetota。

共同研究者・謝辞

本研究は福井県立大学大学院生物資源学研究所の濱野吉十教授と丸山千登勢准教授との共同研究により行われました。本研究の遂行にご助力を賜りました先生方に厚く御礼申し上げます。また、本研究をご支援いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Ferla MP, Patrick WM. Bacterial methionine biosynthesis. Microbiology (Reading). 2014 Aug;160(Pt 8):1571-1584. doi: 10.1099/mic.0.077826-0. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24939187.
- 2) Hasebe F. MetW regulates the enzymatic activity of MetX in Pseudomonas. Biosci Biotechnol Biochem. 2021 Feb 18;85(2):351-358. doi: 10.1093/bbb/zbaa044. PMID: 33604638.
- 3) Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW, Begley TP. Reconstitution of a new cysteine biosynthetic pathway in Mycobacterium tuberculosis. J Am Chem Soc. 2005 Aug 24;127(33):11602-3. doi: 10.1021/ja053476x. PMID: 16104727; PMCID: PMC2536522.