

Title

ギンネム・オジギソウの持つシステイン合成酵素の 分子レベルでの解析

By

Md. Harun-Ur-Rashid

要約

システイン (Cys) 及びミモシン生合成過程において、O-アセチル-L-セリン (OAS) は共通の基質である。O-アセチルセリン (チオール) リアーゼ (OASTL, システイン合成酵素) 存在下において、OASが硫化物イオンと反応すればCys、3-hydroxy-4-pyridone (3H4P) と反応すればミモシンを産生する。本研究において、オジギソウ (*Mimosa pudica*) よりCysの合成のみを行うOASTL、ギンネム (*Leucaena leucocephala*) よりCysとミモシンの合成の両方を行うOASTLがクローニングされた。

オジギソウより初めてクローニングされた、細胞質タイプOASTLのcDNAは、1,410塩基対からなり、大腸菌で産生した組換え酵素は、ミモシンは合成せず、Cysのみを合成した。Cys合成における酵素学的性質は、最適pH及び温度は、それぞれ6.5、50 °Cであった。Cys合成において測定された K_m , K_{cat} , および $K_{cat} K_m^{-1}$ 値は、OASに対しては、 $159 \pm 21 \mu\text{M}$, 33.56 s^{-1} 及び $211.07 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、 Na_2S に対しては、 $252 \pm 25 \mu\text{M}$, 32.99 s^{-1} 及び $130.91 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。この酵素は、

Cys合成に特異的であり、オジギソウにおける細胞内環境の酸化還元ネットワークや硫黄源の貯蔵において、センサーとしての役割を果たしていると考えられる。

高等植物においてOASTLは、Cys合成のためにマルチコピー遺伝子として存在している。それらのいくつかは、様々な種類の β -置換アラニン合成を行う潜在性を有している。今回クローニングされた、ギンネム由来の細胞質タイプOASTLのcDNAは、1,275塩基対からなり、その組換え酵素はCysとミモシンの両方を合成する活性を持っていた。また、その酵素学的性質は、Cys合成、ミモシン合成における最適pHは、それぞれ7.5および8.0であり、最適温度は、それぞれ40 °Cおよび35 °Cであった。 K_m , k_{cat} and $k_{cat} K_m^{-1}$ といった反応速度論解析についても、Cysとミモシン合成両方について、基質OAS および Na_2S または3H4Pを用いて行った。共通の基質であるOASにおける結果は、Cys合成に対する k_{cat} は、ミモシン合成に対して6倍以上の高い値を、 K_m 値は3.7倍低い値を示した、このことはCys合成がより起きやすい反応であることを示唆する。

分子モデリングおよびシミュレーションに基づき、尤もらしいミモシン合成経路が提案された。既知のシロイヌナズナOASTLのK46A変異体およびダイズ β -シアノアラニン合成酵素K95A変異体の結晶構造をモデルとして、ミモシン合成酵素活性中心における α -アミノアクリル酸との複合体が予想された。 α -アクリル酸を保持した、ミモシン合成酵素の3次元構造が作成され、3H4Pとのドッキングが行われた。 α -アクリル酸およびミモシン合成酵素-3H4P複合体間におけるPAICS計算によると、Lys49、Asn80、Arg108 およびArg51の間に強い分子間引力が存在することが示唆された。さらに、3H4Pとミモシン合成酵素- α -アミノアクリル酸複合体の間の相互作用計算によると、3Åの範囲に存在するGly230、Tyr227、Ala231およびGly228の間に強い分子間引力が存在することも示された。

Cysの生合成は、十量体からなるCys合成酵素複合体を形作っている、セリンアセチルトランスフェラーゼとOASTLの連続した反応により行われる。植物OASTLのアイソフォームは、細胞質、プラスチド、ミトコンドリアの3か所に存在する。本研究において、ギンネムより葉緑体型OASTL (Ch-OASTL) が初めて単離され、大腸菌BL-21内で発現された。このCh-OASTLは、1,543塩基対よりなり、391アミノ酸よりなるORFをコードし、計算された分子量は41.54 kDaであった。精製された組換えタンパクはCys合成活性を発現したが、ミモシン合成活性は示さなかった。それゆえこの葉緑体型OASTLは、Cys合成に特異的なCys合成酵素であると考えられた。また、酵素学的研究による最適pHは7.0、最適温度は40°C、 K_m 及び K_{cat} 値は、OASに対してはそれぞれ $838 \pm 26 \mu\text{M}$ 及び 72.83 s^{-1} 、 Na_2S に対してはそれぞれ $60 \pm 2 \mu\text{M}$ 及び 2.43 s^{-1} であった。この葉緑体型OASTLはギンネムの生存に必須であり、硫黄が制限された条件下で制御センサーとして機能しており、様々な物質の代謝において先導的役割を果たしていることが推察される。

以上の結果より解明された、オジギソウおよびギンネムのCysとミモシンの生合成におけるOASTLの特異な性質は、植物における硫黄代謝ネットワークの新たな概念を提示するものと結論される。