

グリオキシル酸回路の新しいスイッチ機構を発見

—代謝工学、感染症予防への応用に期待—

名古屋大学大学院理学研究科（研究科長・松本邦弘）生命理学専攻の中務邦雄（なかつかさくにお）助教、嘉村 巧（かむらたくみ）教授らのグループは、パンやビールの製造に使われる出芽酵母を材料にした研究から、グリオキシル酸回路のオン・オフを制御するスイッチ因子「Ucc1」を発見しました。

グリオキシル酸回路は微生物や植物に特有の代謝経路です。これらの生物はグルコースが不足すると、酢酸や脂肪酸を材料にして、グリオキシル酸回路→クエン酸回路→糖新生という一連の代謝反応によってグルコースを合成します。これまで回路の活性は、グルコースが豊富にあると「オフ」になり、グルコースが不足して、炭素源として酢酸や脂肪酸が細胞内に取り込まれると「オン」になることが知られていましたが、スイッチの詳しいメカニズムは明らかにされていませんでした。グリオキシル酸回路は、微生物によるバイオ燃料生産のプラットフォームとして注目されているだけでなく、病原性酵母（カンジダなど）の感染時に必須の役割を果たすことから、回路の活性制御機構の解明は極めて重要な課題でした。

本研究グループは、回路の中で最初の反応を触媒するクエン酸合成酵素（Cit2）に着目し、グルコースが豊富にあると Ucc1 が Cit2 の分解を促進して、回路の活性を抑制することを見出しました（オフの状態）。また、グルコースが不足して酢酸や脂肪酸からグルコースを作る必要が生じると、Ucc1 が Cit2 から解離して、安定化した Cit2 が回路を活性化することも見出しました（オンの状態）。

本研究は、代謝経路の活性が代謝酵素の「分解」によって制御されるというユニークなスイッチ機構を明らかにしたものとと言えます。今後、バイオ燃料などの有用物質の生産を目指す代謝工学、感染症の克服を目指す医学などの分野で、Ucc1 は重要な「ツール」および「ターゲット」になると期待されます。

本成果は、米国科学誌(Molecular Cell:モレキュラーセル)オンライン版で2015年5月15日（日本時間）に公開されました。

【概要】

名古屋大学大学院理学研究科（研究科長・松本邦弘）生命理学専攻の中務邦雄（なかつかさくにお）助教、嘉村 巧（かむらたくみ）教授らのグループは、パンやビールの製造に使われる出芽酵母を材料にした研究から、グリオキシル酸回路のオン・オフを制御するスイッチ因子「Ucc1」を発見しました。

グリオキシル酸回路は微生物や植物に特有の代謝経路です。これらの生物はグルコースが不足すると、酢酸や脂肪酸を材料にして、グリオキシル酸回路→クエン酸回路→糖新生という一連の代謝反応によってグルコースを合成します。これまで回路の活性は、グルコースが豊富にあると「オフ」になり、グルコースが不足して、炭素源として酢酸や脂肪酸が細胞内に取り込まれると「オン」になることが知られていましたが、スイッチの詳しいメカニズムは明らかにされていませんでした。グリオキシル酸回路は、微生物によるバイオ燃料生産のプラットフォームとして注目されているだけでなく、病原性酵母（カンジダなど）の感染時に必須の役割を果たすことから、回路の活性制御機構の解明は極めて重要な課題でした。

本研究グループは、回路の中で最初の反応を触媒するクエン酸合成酵素（Cit2）に着目し、グルコースが豊富にあると Ucc1 が Cit2 の分解を促進して、回路の活性を抑制することを見出しました（オフの状態）。また、グルコースが不足して酢酸や脂肪酸からグルコースを作る必要が生じると、Ucc1 が Cit2 から解離して、安定化した Cit2 が回路を活性化することも見出しました（オンの状態）。

本研究は、代謝経路の活性が代謝酵素の「分解」によって制御されるというユニークなスイッチ機構を明らかにしたものとと言えます。今後、バイオ燃料などの有用物質の生産を目指す代謝工学、感染症の克服を目指す医学などの分野で、Ucc1 は重要な「ツール」および「ターゲット」になると期待されます。

本成果は、米国科学誌（Molecular Cell：モレキュラーセル）オンライン版で 2015 年 5 月 15 日（日本時間）に公開されました。

【ポイント】

1. 微生物や植物には「グリオキシル酸回路」と呼ばれる代謝経路が備わっている。
2. グリオキシル酸回路の活性は、グルコースが豊富にあると「オフ」、グルコースが不足して炭素源として酢酸や脂肪酸が細胞内に取り込まれると「オン」になる。しかしスイッチのメカニズムには未解明の点が多い。
3. グリオキシル酸回路のオン・オフを制御するスイッチ因子 Ucc1 を発見した。
4. 微生物によるバイオ燃料生産や、病原性酵母の感染予防の分野で、Ucc1 は重要なツールおよびターゲットになると期待される。

【背景】

<グリオキシル酸回路>

細胞内に取り込まれたグルコースは化学反応に必要なエネルギーのもとになるだけでなく、糖鎖や核酸など生体高分子の材料にもなります。もしグルコースが不足すると、多くの生物はグリコーゲンやアミノ酸を材料にしてグルコースを作り出すことが知られています。植物と微生物の一部には、グルコースを作り出すもう一つ別の仕組み「グリオキシル酸回路」が備わっています。この回路は、酢酸や脂肪酸から作られたアセチル CoA をグルコースに変換する一連の代謝反応の初期段階を担っています（図1）。具体的には、酢酸や脂肪酸から作られたアセチル CoA がグリオキシル酸回路に取り込まれて、コハク酸が合成されます。コハク酸は、ミトコンドリアの中にあるクエン酸回路に取り込まれて、オキサロ酢酸に変換されます。そして、オキサロ酢酸は細胞質に輸送され、糖新生と呼ばれる経路に取り込まれて、最終的にグルコースが合成されます（図1）。グリオキシル酸回路は植物の発芽、病原性酵母の感染、菌類の性分化など、グルコースが不足しやすい状況で、必須の役割を担っていることが知られています。また、グリオキシル酸回路の活性は、細胞内のアセチル CoA の量に直接影響することが知られています。アセチル CoA は様々なバイオ燃料の重要な材料になるので、代謝工学の観点からも、グリオキシル酸回路の活性制御機構は重要な課題として注目されています。

一般的に代謝経路は、代謝酵素遺伝子の転写・翻訳など、酵素の合成段階で制御されることがよく知られています。また、リン酸化などの翻訳後修飾が代謝酵素の活性を調節することもあります。さらに、上流または下流の代謝産物が代謝酵素に結合してその活性調節をおこなう、フィードバック、フィードフォワード制御も古くから研究されてきました。グリオキシル酸回路についても、酵素の「合成」または「活性調節」による制御が研究されてきました。しかしながら近年、代謝経路は酵素の「分解」によっても制御されることが明らかになりつつあります。グリオキシル酸回路について、そのような「分解」による制御は知られていませんでした。

<ユビキチン・プロテアソーム分解系>

ユビキチン・プロテアソーム系は代表的なタンパク質の分解系で、様々な細胞機能の制御に関わっています。この分解系では、標的となる基質タンパク質にユビキチンという約8kDの小さなタンパク質が付加されます。多くの場合、ユビキチンは連続して複数個付加されてポリユビキチン鎖を形成します。ポリユビキチン鎖が“目印”となって、基質タンパク質はプロテアソームという巨大なタンパク質分解酵素によって分解されます（図2）。基質にユビキチンを付加する酵素は E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ）と呼ばれており、基質を認識する役割を担っているのが E3 です。E1、E2、E3 の順に種類が増え、E3 が最も種類が多く存在します。出芽酵母では約100種類、哺乳類では約700種類が知られていま

す。さらに E3 には、単量体で機能するものと複合体を形成して機能するものがあります。複合体型 E3 としてよく知られているのが SCF 複合体です (図 3)。SCF 複合体は Skp1、Cullin (酵母では Cdc53)、Rbx1、F ボックスタンパク質から構成されています。この中で、Skp1、Cullin、Rbx1 は不変因子ですが、F ボックスタンパク質は可変因子で、出芽酵母では約 20 種類、哺乳類では約 70 種類、高等植物では約 700 種類あると言われています。それぞれの F ボックスタンパク質が特異的な基質を認識することによって、SCF 複合体は多様な基質の制御に関わっていると考えられています。SCF 複合体の生理機能を解明するには、F ボックスタンパク質によって認識される特異的な基質の同定が不可欠ですが、基質が判明している F ボックスタンパク質はごく僅かです。また、SCF 複合体だけでなく、他の E3 ユビキチンリガーゼについても、特異的な基質の同定は極めて重要な課題となっています。現在、世界中のグループが、“E3 と基質” の新しいペアの発見を目指してしのぎを削っています。

【研究の内容】

本研究では、機能未知であった出芽酵母の F ボックスタンパク質 Ylr224w (後に Ucc1 と命名) の解析を目的として、Ucc1 と結合するタンパク質を網羅的に検索しました。その結果、クエン酸合成酵素 Cit2 を同定しました。クエン酸合成酵素はアセチル CoA とオキサロ酢酸からクエン酸を作り出す酵素で、出芽酵母には Cit1、Cit2、Cit3 の 3 種類が存在します。Cit1 と Cit3 はミトコンドリアの中にあるクエン酸回路で機能することが知られています。クエン酸回路の酵素のほとんどはミトコンドリアの中に局在しています。一方で、グリオキシル酸回路の酵素はペルオキシソームとサイトソルの両方またはどちらかに局在しています。また、グリオキシル酸回路の酵素の局在は、生物種や生育条件によっても異なると考えられています。Cit2 がグリオキシル酸回路で機能することは知られていましたが、その細胞内局在は十分に明らかにされていませんでした。そこで蛍光顕微鏡観察および細胞分画実験を行ったところ、Cit2 はペルオキシソームと細胞質の両方に局在することがわかりました。また、Ucc1 は細胞質に局在することも明らかになったことから、両者は細胞質で相互作用すると考えられました。Cit2 と Ucc1 の両方が細胞質に局在することは、ユビキチン・プロテアソーム系が細胞質および核で機能することとよく一致しています。

Cit2 が Ucc1 によって認識されることが分かったので、次に Cit2 が Ucc1 によって制御される分解基質であるか検討しました。様々な生化学的・遺伝学的解析から、Cit2 は Ucc1 によってポリユビキチン鎖が付加されること、ユビキチン修飾された Cit2 は半減期約 60 分でプロテアソームによって分解されることなどが明らかになりました。実際 Ucc1 を欠損させると、分解が抑制された Cit2 が細胞内に蓄積して、クエン酸濃度が上昇しました。興味深いことに Ucc1 を過剰発現 (結果として Cit2 量が減少する)、または Cit2 を欠損させた酵母は 1%ブタノール耐性になることがわかりま

した。代謝工学、合成生物学の分野では、出芽酵母にブタノールを大量合成させる試みが進んでいます。培地中に1%といった高濃度のブタノールが存在すると、野生型の酵母には有害でほとんど生育できません。しかし、酵母にブタノールを高い効率で合成させるには、自らが培地中に放出したブタノールに耐性でなければならないと考えられています。Ucc1 の過剰発現または Cit2 の欠損によって酵母がブタノール耐性になる仕組みは今後の検討課題ですが、グリオキシル酸回路の改変がブタノールの生産効率の上昇につながる可能性を示唆する結果といえます。

それでは Ucc1 による Cit2 の認識はどのように制御されているのでしょうか。グリオキシル酸回路は酢酸をグルコースに変換する一連の代謝反応の最初に位置します。実際、Cit2 および Ucc1 の転写量の解析から以下のことが分かりました。

- 酢酸を炭素源とした酵母：「Cit2 の転写が上昇」「Ucc1 の転写が下降（その結果 Cit2 の分解がおこらなくなる）」→ “Cit2 タンパク質の量が増大”
- グルコースを炭素源とした酵母：「Cit2 の転写が下降」「Ucc1 の転写が上昇（その結果 Cit2 の分解を促進する）」→ “Cit2 タンパク質の量が減少”

つまり、Ucc1 と Cit2 は炭素源に応じて転写レベルで「量的に制御」されると考えられました。

本研究ではさらに、Ucc1 による Cit2 の認識には「質的な制御」もあることを見出しました。研究グループの最も得意とする実験手法の一つに「試験管内アッセイ系」があります。具体的には、必要なタンパク質を大腸菌、酵母、昆虫細胞などで人工的に合成させ、精製したタンパク質を試験管内で反応させることによって、反応機構を詳細に調べるものです。本研究では、ユビキチン化反応に必要な E1 (Uba1)、E2 (Cdc34)、E3 (SCF^{Ucc1})、ユビキチンを精製し、さらにマグネシウムと ATP (アデノシン三リン酸) を加えて、試験管内でインキュベートしました。その結果、Cit2 のポリユビキチン化を再現することに成功しました (図4)。

ところで、クエン酸合成酵素はオキサロ酢酸とアセチル CoA からクエン酸を作り出す酵素で、その反応機構は古くから詳細に調べられています。オキサロ酢酸と結合していないクエン酸合成酵素は、“開状態 (オープンコンフォメーション)” の構造をとっています。オキサロ酢酸が結合すると、開状態から“閉状態 (クローズドコンフォメーション)” になります。さらに、オキサロ酢酸が結合したクエン酸合成酵素には、新たにアセチル CoA が結合するための“ポケット” が形成されます。そこに結合したアセチル CoA とオキサロ酢酸から、縮合反応によってクエン酸が作られます (図5)。我々は、オキサロ酢酸が Cit2 の構造変化を誘起することに着目して、オキサロ酢酸が Cit2 のユビキチン化に与える影響を、先ほどの試験管内アッセイ系によって調べました。驚いたことに、オキサロ酢酸が結合していない開状態の Cit2 は、Ucc1 と強く結合する

ためユビキチン化を受けやすいこと、逆にオキサロ酢酸と結合した閉状態の Cit2 は、Ucc1 によって認識されにくくなり、ユビキチン化を回避することが分かりました。簡単に言うと、「オキサロ酢酸が Cit2 のコンフォメーション変化を誘起して、ユビキチン化を阻害すること」が分かりました。

過去の研究から、酢酸や脂肪酸を炭素源として酵母を培養すると、グリオキシル酸回路やクエン酸回路が活性化して、代謝中間体の量が増大することが知られていました。つまり、回路の代謝中間体の流量が増えると、量が増えたオキサロ酢酸が Cit2 に結合して分解を阻害する、その結果、回路はさらに安定的に回り続けるという「正のフィードバックループ (=質的な制御)」が存在することが強く示唆されました。実際、酢酸を炭素源とした酵母では、ユビキチン・プロテアソーム系そのものは機能しているにも関わらず、Cit2 は安定で全く分解されないことがわかりました。

以上の結果をもとに、ユビキチンリガーゼ SCF^{Ucc1} の役割についてまとめました (図 6)。

グルコースを炭素源とした場合、Cit2 は SCF^{Ucc1} によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解されるので、結果としてグリオキシル酸回路の活性は低レベルに抑制される。酢酸を炭素源とした場合、Cit2 の発現が上昇して Ucc1 の発現が低下する。またオキサロ酢酸を含む代謝中間体の流量が多くなる。オキサロ酢酸と結合した Cit2 は Ucc1 による認識を免れるので、ユビキチン化されにくくなり安定化する (正のフィードバック制御)。その結果、グリオキシル酸回路はますます活性化され、最終的にグルコースが合成される。

このような「分解」によるグリオキシル酸回路の制御機構が、他の微生物、植物にどの程度保存されているのか、今後の重要な研究課題となります。

【成果の意義】

グリオキシル酸回路の活性は、細胞内におけるアセチル CoA の量に直接的な影響を与えられていると考えられています。また、アセチル CoA は様々なバイオ燃料の前駆体にもなりうると考えられています。さらに、理由はまだ明らかでないですが、Ucc1 を過剰発現させると酵母が 1%ブタノールに耐性になることも分かりました。グリオキシル酸回路の活性を Ucc1 によってうまく調節できれば、バイオ燃料の生産効率上昇につながる可能性が期待できるかもしれません。

出芽酵母の仲間には病原性のカンジダ酵母があります。常在菌であるカンジダ酵母は人間の免疫力などが低下したときに増殖します。カンジダ酵母の感染には、グリオキシル酸回路の活性化が必須であることが知られています。たとえば Ucc1 の機能を特異

的に活性化させる薬剤を開発できれば、カンジダ酵母の感染を低減させることができるかもしれません。

本研究は基本的な代謝経路の制御機構を明らかにしただけでなく、代謝工学、感染症予防の分野にも高いインパクトを与えるものと考えられます。さらに、高等植物には約700種類のFボックスタンパク質がコードされています。グリオキシル酸回路だけでなく、様々な代謝経路が代謝酵素の分解によって制御されている可能性が十分に考えられます。逆に、代謝経路を分解によって自由自在に制御することができれば、微生物や植物による有用物質の生産、あるいはストレスに強い植物の育種など、様々な工学的応用につながると期待されます。

【用語説明】

グリオキシル酸回路

植物や微生物の一部にみられる代謝経路（図1参照）。

クエン酸回路

ミトコンドリア内にある代謝経路（図1参照）。アセチルCoAから出発して、ATPやNADHなどの形でエネルギーが産生される。

解糖系

グルコースをピルビン酸などに分解する過程で、グルコースに含まれる結合エネルギーをATPなどに変換する反応系。

糖新生

飢餓状態に陥った時、ピルビン酸やアミノ酸など、糖質以外の物質からグルコースを作る反応。ほぼ解糖系の逆反応に沿って進む。

クエン酸合成酵素

アセチルCoAとオキサロ酢酸からクエン酸を作り出す酵素。

ユビキチン・プロテアソーム系

タンパク質に付加されたポリユビキチン鎖を目印に、プロテアソームがATP依存的で不可逆的に標的タンパク質を分解する系。

【論文名】

Molecular Cell

“The ubiquitin ligase SCF^{Ucc1} acts as a metabolic switch for the glyoxylate cycle”

Kunio Nakatsukasa*, Takashi Nishimura, Stuart D. Byrne, Michiyo Okamoto,
Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Fumihiko Okumura, and Takumi Kamura*

*Corresponding authors

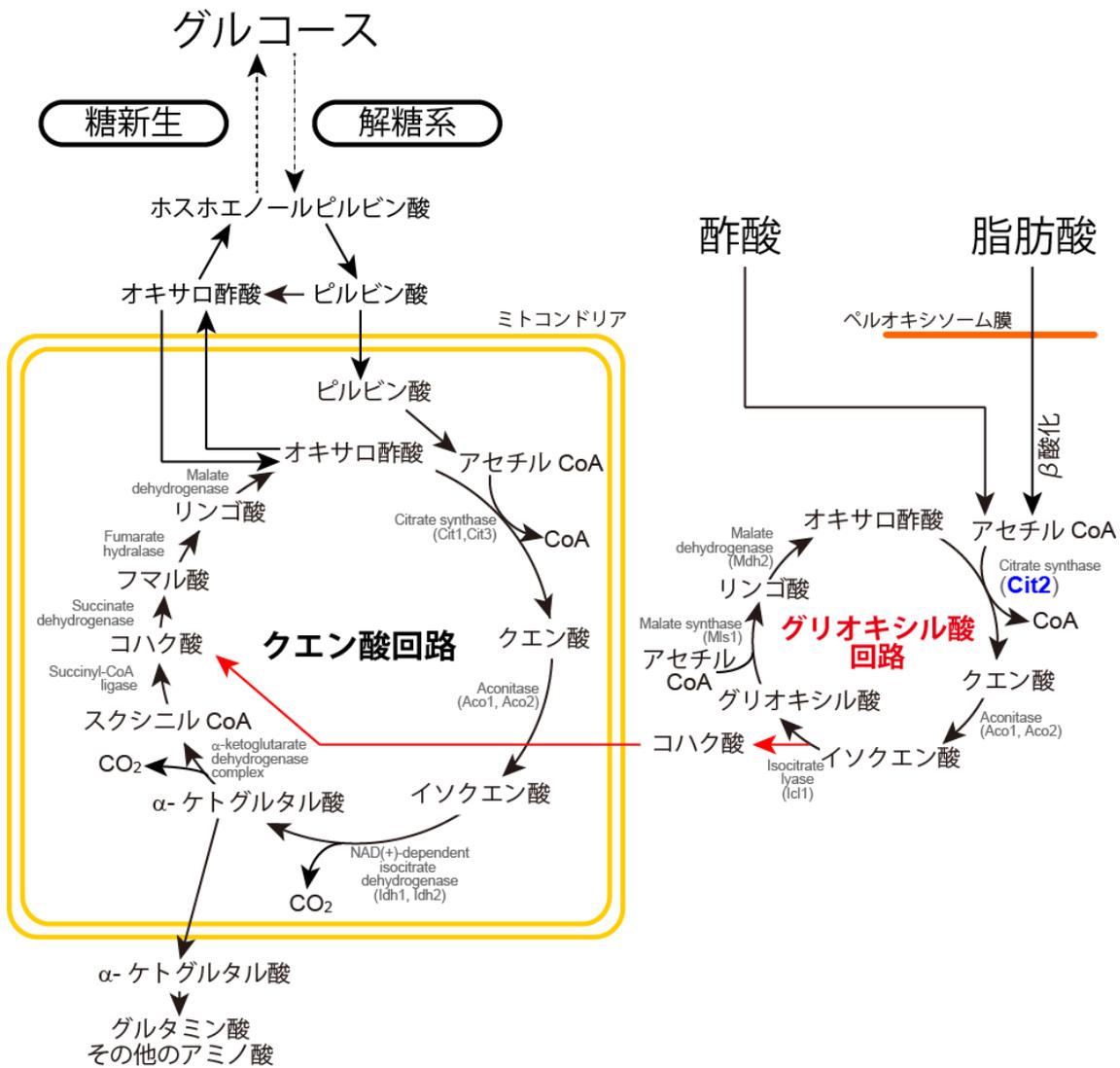
モレキュラーセル

「ユビキチンリガーゼ SCF^{Ucc1} はグリオキシル酸回路の代謝スイッチとして機能する」

中務邦雄*、西村崇、スチュアート バーン、岡本美智代、高橋（中口）梓、知花博治、
奥村文彦、嘉村巧*

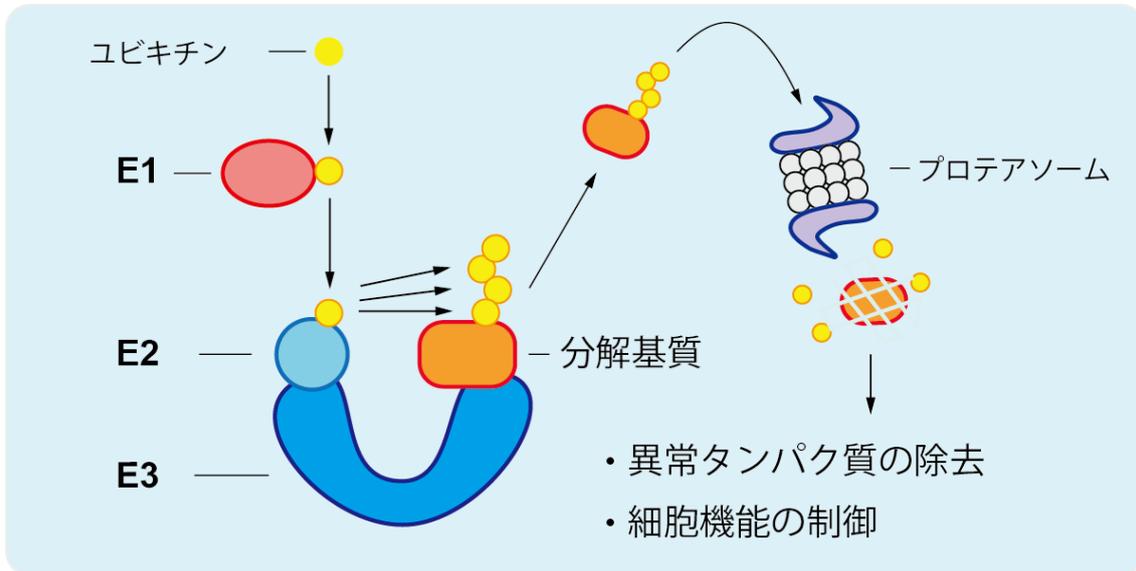
*責任著者

図1：クエン酸回路とグリオキシル酸回路



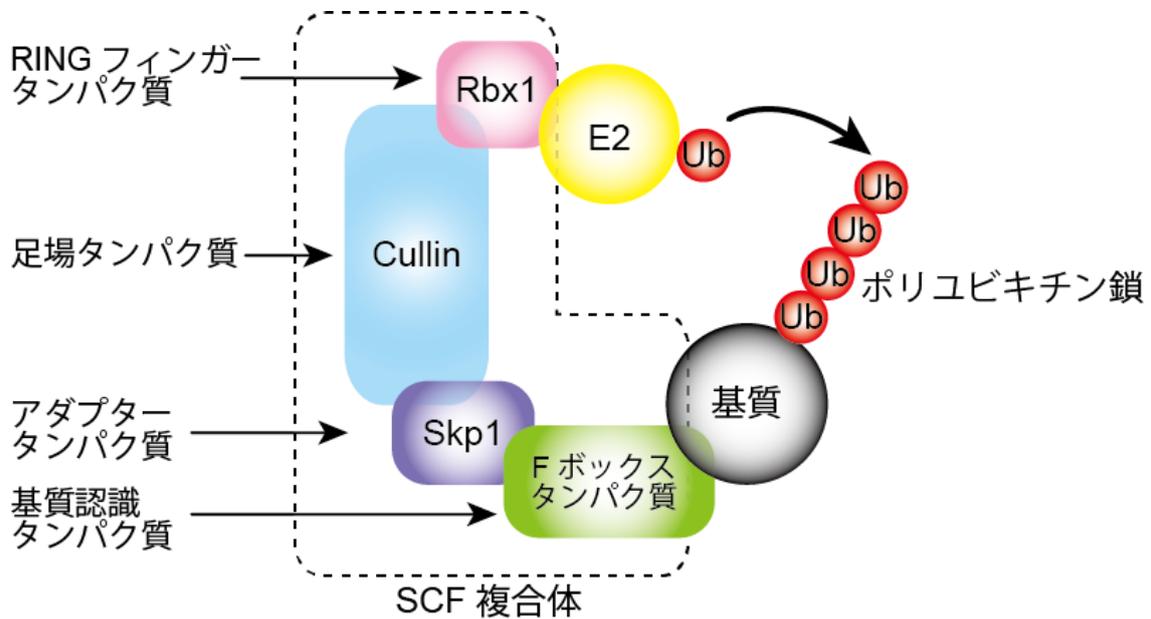
酢酸や脂肪酸から作られたアセチル CoA はグリオキシル酸回路でコハク酸に変換される。コハク酸はミトコンドリアのクエン酸回路に取り込まれて、オキサロ酢酸になる。オキサロ酢酸は細胞質に輸送され、糖新生と呼ばれる経路の出発材料となり、最終的にグルコースが作られる。グリオキシル酸回路は植物の発芽、病原性酵母の感染、菌類の性分化など、グルコースが不足しやすい状況で必須の役割を担っている。また、グリオキシル酸回路の活性は細胞内のアセチル CoA の量に直接影響する。アセチル CoA は様々なバイオ燃料の重要な前駆体になるので、代謝工学の観点からもグリオキシル酸回路の活性制御機構は重要な課題として注目されている。

図2：ユビキチン・プロテアソーム分解系



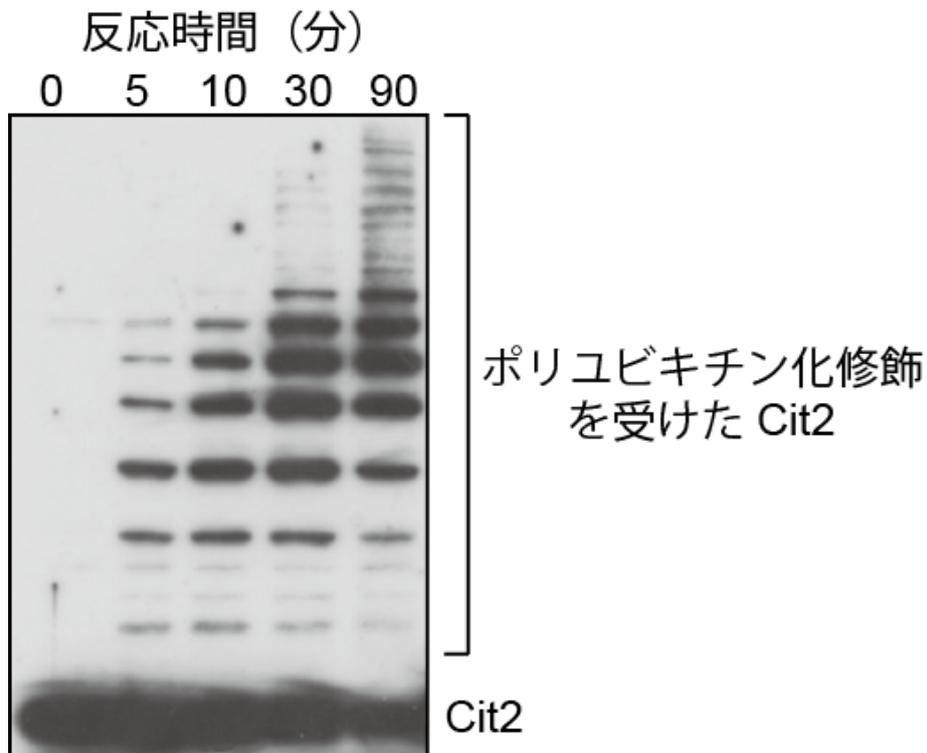
ユビキチンはE1によって活性化され、E2へ受け渡される。標的となる分解基質はE3によって認識される。ユビキチンはE2から基質タンパク質に転移する。この反応が繰り返され、ポリユビキチン鎖が形成される。ポリユビキチン鎖が分解シグナルとなり、基質タンパク質はプロテアソームによって分解される。

図3：SCF 複合体



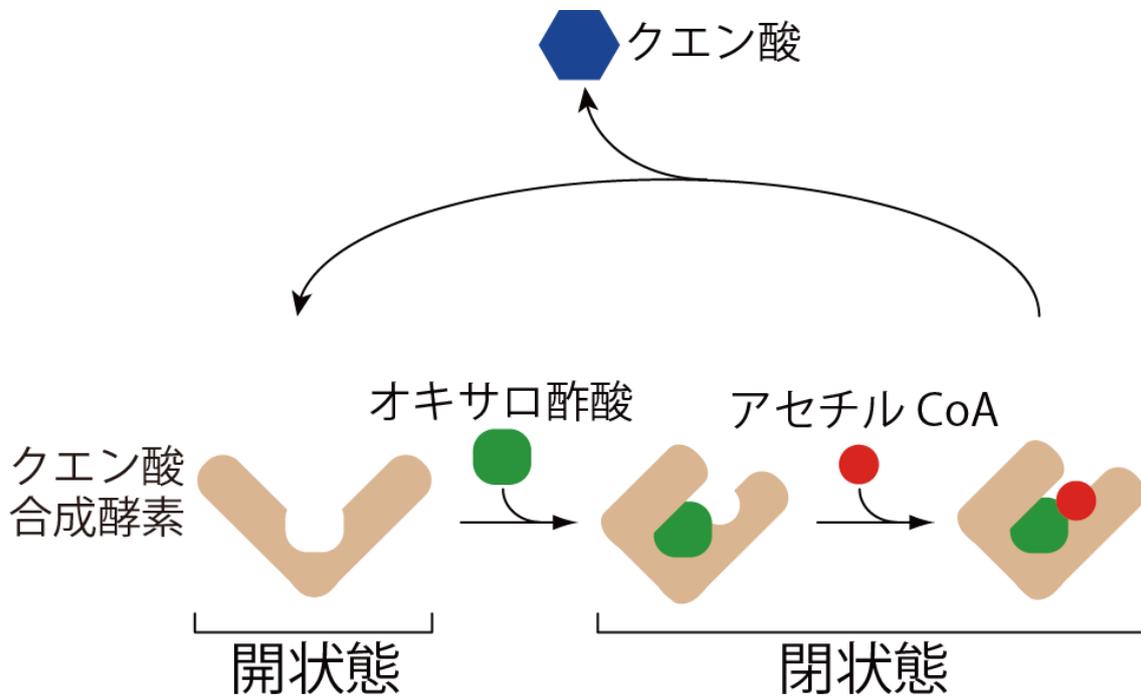
SCF 複合体は Skp1、Cullin、Rbx1、F ボックスタンパク質から構成されている。Skp1、Cullin、Rbx1 は不変因子であるが、F ボックスタンパク質は可変因子で、出芽酵母では約 20 種類、哺乳類では約 70 種類、高等植物では約 700 種類あると言われている。それぞれの F ボックスタンパク質が特異的な基質を認識することによって、SCF 複合体は多様な基質の分解を制御している。

図4：Cit2 の試験管内ユビキチン修飾反応



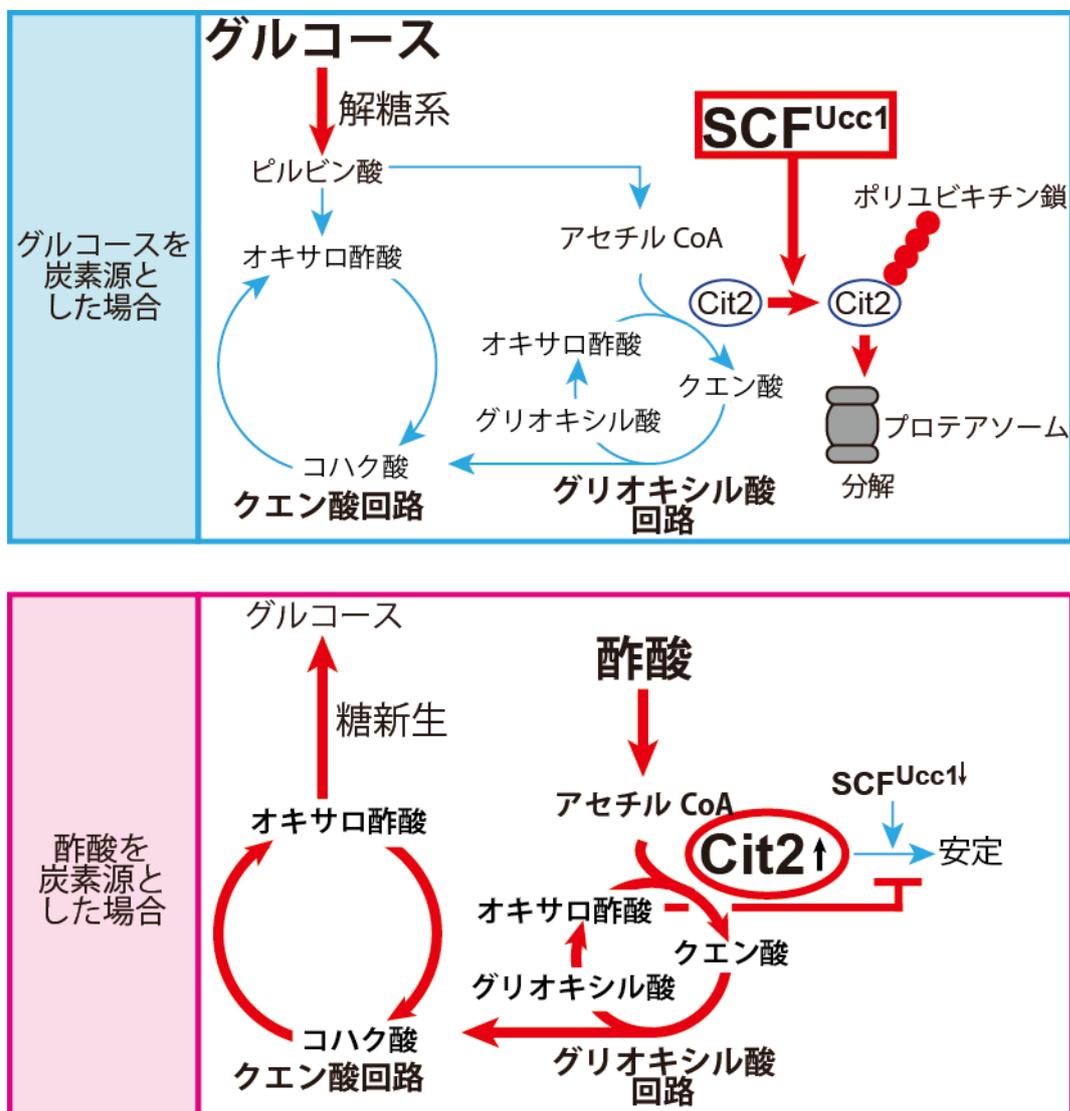
Cit2 のユビキチン化反応に必要な E1 (Uba1)、E2 (Cdc34)、E3 (SCF^{Ucc1})、ユビキチンを精製し、さらにマグネシウムと ATP (アデノシン三リン酸) を加えて試験管内でインキュベートした。反応物を SDS-PAGE によって展開して、ウエスタンブロットリングによって Cit2 を検出した。反応の時間経過に従って、Cit2 がポリユビキチン化される様子が観察された。

図5：クエン酸合成酵素の反応機構



オキサロ酢酸と結合していないクエン酸合成酵素は“開状態（オープンコンフォメーション）”にある。オキサロ酢酸が結合すると“開状態”から“閉状態（クローズドコンフォメーション）”になる。オキサロ酢酸が結合したクエン酸合成酵素には新たにアセチル CoA が結合するための“ポケット”が新たに形成され、そこに結合したアセチル CoA とオキサロ酢酸から縮重反応によってクエン酸が作られる。試験管内ユビキチン化アッセイから、開状態の Cit2 方が SCF^{Ucc1} に認識されてユビキチン化を受けやすいことがわかった。

図6：ユビキチンリガーゼ SCF^{Ucc1} はグリオキシル酸回路の代謝スイッチとして機能する



ユビキチンリガーゼ SCF^{Ucc1} の役割のモデル図。グルコースを炭素源とした場合、Cit2 は SCF^{Ucc1} によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。その結果、グリオキシル酸回路の活性は低レベルに抑制される。酢酸を炭素源とした場合、Cit2 の発現が上昇して Ucc1 の発現が低下する。また、活性化されたグリオキシル酸回路ではオキサロ酢酸を含む代謝産物の流量が多くなる。オキサロ酢酸が結合した Cit2 は Ucc1 による認識を免れるのでユビキチン化されにくくなり安定化する（正のフィードバック制御）。その結果、グリオキシル酸回路はますます活性化され、最終的にグルコースが合成される。