

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	抗生物質アラレマイシン合成酵素と5-アミノレブリン酸合成酵素の進化的関連性
Title(English)	Evolutionary relationship between antibiotic alaremycin synthesizing enzyme and 5-aminolevulinate synthase
著者(和文)	川口潤
Author(English)	Jun Kawaguchi
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12746号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:和地 正明,伊藤 武彦,福居 俊昭,本郷 裕一,田中 寛
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12746号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	川口 潤		審査員主査： Chief Examiner	和地 正明

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

ポルフィリンは呼吸や光合成に欠かせない補因子であるため、ポルフィリン生合成は多くの生物にとって重要な代謝経路である。ポルフィリン生合成の第一段階は 5-アミノレブリン酸 (ALA) の合成であるが、自然界にはまったく異なる二種類の ALA 生合成経路が存在し、それぞれ C₅ 経路と Shemin 経路と呼ばれる。C₅ 経路はほとんどの細菌とアーキアに保存されていることから起源の古い経路であると考えられる。一方で、Shemin 経路は動物や真菌などの比較的進化の進んだ生物に保存されているため後発的に誕生した経路であると考えられるが、その起源や進化過程は未解明であった。Shemin 経路においては、ALA 合成酵素 (ALAS) がグリシンとスクシニル CoA を縮合することで ALA が合成される。ここで、抗生物質アラレマイシンは ALAS ホモログによって生合成されることが先行研究により明らかとなり、AlmA と命名されたその酵素はセリンとスクシニル CoA を縮合してアラレマイシン中間体を合成することが示唆された。AlmA は C₅ 経路を用いる細菌から発見されたため、その起源は真核生物を中心に分布する ALAS よりも古いと推測された。こうした背景から、ALAS (Shemin 経路) の起源は AlmA 様の抗生物質合成酵素であると予想された。本研究では、AlmA と ALAS の進化的関連性を解析することで Shemin 経路の起源解明を試みた。加えて、セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) が ALAS と似たように抗生物質合成酵素を進化起源とする可能性があることを見出したため、SPT の解析を行うことで抗生物質合成酵素が新規酵素の起源となる可能性を探った。

AlmA と ALAS の機能的な差は、それらの基質認識の差に由来すると予想された。両者の基質認識を隔てる因子を解明することができれば、AlmA と ALAS がどのような変異によって共通祖先タンパク質から分岐したのか、その進化過程を予測することができると考えた。そこで、AlmA に部位特異的変異を導入してその機能を ALAS 様に改変する機能改変実験を試みた。はじめに野生型 AlmA の酵素活性を測定したところ、AlmA はセリンを基質としたアラレマイシン中間体合成活性と同時に、弱いながらもグリシンを基質とした ALA 合成活性を有することが明らかとなった。さらに AlmA の基質ポケット周辺にふたつのアミノ酸残基置換を施すと、アラレマイシン中間体の合成活性が顕著に低下するものの ALA 合成活性は維持された。この二重置換 AlmA を ALA 要求性大腸菌変異株へ導入するとその生育が相補されたことから、二重置換 AlmA は生理的条件下において ALAS 様の機能を示すことが確認された。よって AlmA から ALAS への変化は容易に起こり得ることが示唆された。

祖先配列復元は、現存する複数の配列を基にそれらの祖先配列を推定し復元する分子系統解析手法である。この手法により AlmA と ALAS の共通祖先タンパク質を復元してその機能を解析することで、AlmA と ALAS の起源解明を目指した。祖先配列復元により、祖先 AlmA、祖先 ALAS、共通祖先酵素の 3 つの配列を復元した。それらの酵素活性を測定した結果、祖先 AlmA と共通祖先酵素は主にセリンを基質としてアラレマイシン中間体を、祖先 ALAS はグリシンを基質として ALA を合成することが明らかとなった。共通祖先酵素が AlmA 様の活性を有していたことから、ALAS の起源は AlmA 様の抗生物質合成酵素である可能性が支持された。

SPT は細胞膜を構成するスフィンゴ脂質の生合成酵素のひとつであり、真核生物を中心に保存されている。ところが、多数の細菌種が機能未知の SPT ホモログを所持していることが遺伝子データベース上で確認された。さらに SPT の生成物の類縁体であるスフィンゴシンは抗菌活性を持つことから、細菌の SPT ホモログは抗生物質合成酵素として機能する可能性が考えられた。よって、SPT は ALAS と同じく抗生物質合成酵素を起源に持つと予想された。まずは細菌 SPT ホモログの機能を明らかにするため、いくつかの細菌種が持つ SPT ホモログを大腸菌に導入してその生育と細胞形態を観察した。その結果、SPT ホモログ導入株の生育は最少培地上で阻害された。また、*Pseudomonas asuensis* 由来の SPT ホモログとその上流遺伝子を大腸菌へ導入したところ、細胞長の増大や細胞内に顆粒状構造体の形成が確認された。SPT ホモログは大腸菌の生育や細胞形態に悪影響を及ぼしたことから、細菌がもつ SPT ホモログは抗生物質合成酵素として機能する可能性が支持された。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	川口 潤		審査員主査： Chief Examiner	和地 正明	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Porphyrin biosynthesis is a crucial metabolic pathway in many organisms. The initial step in this process is the synthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA), which can occur via two distinct pathways: the C₅ pathway and the Shemin pathway. The Shemin pathway is believed to have emerged later, but its origin and evolutionary process remain unclear. Previous studies have indicated that the antibiotic alaremycin is synthesized by an ALAS homolog, named AlmaA, which appears to predate ALAS. This led to the hypothesis that ALAS originated from an AlmaA-like antibiotic synthesizing enzyme.

To uncover the origin of ALAS, we analyzed the evolutionary relationship between AlmaA and ALAS through functional transformation and ancestral sequence reconstruction. Firstly, we performed a functional transformation from AlmaA to ALAS to understand the mutations necessary for AlmaA's evolution into ALAS. As a result, the AlmaA-S82T/G86S variant, which has a modified substrate pocket, was able to restore the growth of an ALA auxotrophic *E. coli* strain. This suggests that the evolutionary barrier from AlmaA to ALAS is not high and could be achieved with a few mutations. Secondly, we conducted an ancestral sequence reconstruction of AlmaA and ALAS. The common ancestral protein of AlmaA and ALAS (CA) was reconstructed, and its kinetic parameters were determined. It appears that CA has a similar substrate specificity to AlmaA, leading us to conclude that ALAS likely originated from an AlmaA-like enzyme.

Inspired by the evolution from an AlmaA-like enzyme to ALAS, we hypothesized that other antibiotic-synthesizing enzymes have the potential to evolve into novel enzymes. We found that the enzyme SPT (serine palmitoyltransferase), part of the sphingolipid biosynthesis pathway, has a similar background to ALAS, leading to speculation that SPT originated from an antibiotic-synthesizing enzyme. We investigated bacterial SPT homologs with unknown function and found that its expression disrupts the growth and cell morphology of *E. coli*. This suggests that bacterial SPT homologs with unknown function may act as an antibiotic-synthesizing enzyme, supporting our evolutionary hypothesis.

In summary, our analysis of the evolutionary relationship between AlmaA and ALAS suggests that the Shemin pathway originated from an AlmaA-like antibiotic-synthesizing enzyme. Furthermore, our analysis on bacterial SPT homologs with unknown function suggest that antibiotic-synthesizing enzymes have the potential to evolve into novel enzymes.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).