

令和元年5月27日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07297

研究課題名(和文)新規アコニターゼX酵素の機能解析

研究課題名(英文)Functional characterization of novel aconitase X enzyme

研究代表者

渡邊 誠也 (Watanabe, Seiya)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：90379032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アコニターゼスーパーファミリーの7つのサブファミリーのうちアコニターゼX (AcnX)のみ機能が不明であったが、本研究によりシス-3-ヒドロキシ-L-プロリン(C3LHyp)の脱水酵素であることが分かっていた。これをもとに本研究では、ESR測定、部位特異的変異、X線結晶構造解析によりAcnXの活性部位に存在するユニークな鉄配位様式と触媒メカニズムを明らかにした。また、四次構造と生物種によって異なる別のタイプのAcnXの機能を解析し、C3LHypを資化できる細菌において実際にC3LHyp代謝経路に含まれていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の機能未知タンパク質のアノテーションは、機能既知のタンパク質との一次構造の相同性に大きく依存している。これに対し本研究は、ターゲットとする機能未知タンパク質のアミノ酸配列(“見た目”)より遺伝子の遺伝子の位置関係(“周り”)を重視したアノテーション手法の洗練を行ってきた。ゲノム構造がコンパクトな微生物では代謝系の遺伝子(酵素)群がクラスター化している場合が多く、構成される遺伝子の機能には相関がありそこから酵素の基質をイメージできると考えた。本研究のアコニターゼXはまさにそうして見つかったものであり、今後も新規酵素が発見できると確信している。

研究成果の概要(英文)：Aconitase X (AcnX), one of seven subfamilies in aconitase superfamily, shows no homologous reaction to known aconitase enzymes. Alternatively, I previously found that AcnX protein catalyzes the dehydration of cis-3-hydroxy-L-proline (C3LHyp). Therefore, in this study, I attempted to estimate the binding mechanism of iron, and physiological role(s). As results, ESR, site-directed mutagenic, and X-ray crystallographic studies revealed an unique iron coordination in the active center. Furthermore, characterization of other type of AcnX with different tertiary structure revealed that this enzyme is surely involved in C3LHyp metabolism of C3LHyp assimilating bacteria.

研究分野：酵素化学

キーワード：アコニターゼX ヒドロキシプロリン 分子進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在のタンパク質機能推定には主にアミノ酸配列の相同性検索が用いられるが、機能既知のホモログがあることが大前提となる。これに対し本研究者は、微生物ゲノム上の遺伝子クラスターに着目したアノテーションが、特に低い相同性しかない遺伝子の機能同定に大きな威力を発揮することを示してきた。

アコニターゼスーパーファミリー (Conserved Domain 01351) は一次構造の相同性に基づき7つのサブファミリーに分類されている。このうち6つのメンバーは、類似した構造を持つ多価カルボン酸基質に対してヒドロキシル基と特定の水素原子を取り出し立体化学的に異性化する反応を触媒する。AcnX は、比較ゲノム解析により細菌や古細菌のゲノムに広く分布するアコニターゼ様遺伝子として報告された。しかし、既知の触媒反応は全く見られず、この時点で本酵素の機能推定には何の手がかりもない状況であった。これに対し本研究者は、上記のようにこの遺伝子が細菌のヒドロキシプロリン代謝遺伝子(群)の近傍にしばしば見られることに注目し、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 の AcnX 遺伝子 (PA1259; PaAcnX) がヒドロキシプロリン代謝と何らかの関連があるとの仮定のもと、組み換えタンパク質に各種(ヒドロキシ)プロリンアナログを基質として与えた。その結果、これまで生理学的に全く注目されていなかったシス-3-ヒドロキシ-L-プロリン(C3LHyp)のみが(補因子非依存的に)速やかに消費された。その後の反応生成物の解析で、C3LHypの3位水酸基とC 水素の間の脱水反応により反応中間体として²-ピロリン-2-カルボン酸を形成し、その後非酵素的異性化により¹-ピロリン-2-カルボン酸(Pyr2C)を生じる新規C3LHyp脱水酵素(EC 4.2.1.-)であることが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

このような予備的知見に基づき本研究では、以下の2点についてAcnXの生化学的および分子生物学的解析を行うこととした。

AcnXの触媒メカニズムの解明

既知のアコニターゼ酵素において高度に保存される活性部位約30箇所のうち、AcnXの中で保存されている部分はわずか2割程度しかない。既知のアコニターゼ型酵素の最も重要な特徴は、4Fe-4S鉄硫黄クラスターの存在であり、酸素にきわめて弱い。対照的に、PaAcnXは数カ月は十分保存可能である。アコニターゼ型酵素の4Fe-4S鉄硫黄クラスター結合部位である3つのシステインはPaAcnXでは1箇所しか保存されていないが、本精製酵素は一般的な鉄含有タンパク質と同様に茶色を呈している。そこで、野生型酵素における鉄の配位状態をEPRによって解析した。

AcnXホモログ酵素の機能解析

AcnXは四次構造と生物種によって3タイプがあり、シングルポリペプチドからなり(PaAcnXを含む)細菌と真核微生物に存在するタイプIと、大小のサブユニットからなると思われるタイプIIに分かれる。タイプIIは、さらに細菌由来のタイプIIaと古細菌由来のタイプIIbに分かれるが、これらの遺伝子はヒドロキシプロリン遺伝子クラスターには存在せず機能は不明だった。そこで、後述のようにタイプIIaとして*Azospirillum brasilense*、タイプIIbとして*Aeropyrum pernix*をターゲットに機能解析を行った。

3. 研究の方法

4. 研究の成果

AcnXの触媒メカニズムの解明

これまでのESRと部位特異的変異体の解析から、[4Fe-4S]鉄硫黄クラスター含有アコニターゼ酵素と対照的な単核Fe(III)の存在と、その結合部位の候補として2個のシステインと1個のグルタミン酸残基を同定していた。本研究で、再度ESR測定を行ったところこれまでに見られなかった低磁場側(単核鉄由来?)に加え高磁場側にもシグナル(2種類の分子種?)が観察された。しかし、シグナルのg値や温度依存性はいずれの鉄硫黄クラスターとも一致せず、解釈に苦しんだ。そこで、当初の予定にはなかったが、の立体構造決定に着手した。

AcnXホモログ酵素の機能解析

これまでに、窒素固定性菌の一種*Azospirillum brasilense*がT4LHypとT3LHypの両方を資化できることが分かっていた。本研究では、本菌がこれに加えC3LHypも迅速に資化(生育)でき、さらにC3LHypによって無細胞抽出液中にC3LHyp脱水酵素とPyr2C還元酵素活性が顕著に誘導されることが見出された。これはおそらくC3LHypの生物的分解の初めての例である。本菌のゲノムは*Burkholderia lata*とくわめてよく似ており、この情報を利用するとタイプIIa型のAcnXを持つと考えられた。そこで、小サブユニットのみにヒスチジンタグを付与して大サブユニットとともに大腸菌で発現させニッケルカラムで精製したところ、共精製されたことから予想通りヘテロ二量体であることが分かった。精製酵素にはタイプIのAcnXと同様のC3LHyp脱水酵素活性があり、カイネティックパラメーターや阻害剤に対する挙動もよく似ていた。また、*Intrasporangium calvum*や*Micromonospora viridifaciens*といった別の細菌のタイプIIa型AcnXでも同じ結果が得られ、これらの遺伝子はヒドロキシプロリン遺伝子クラスターに含まれていた。タイプIとタイプIIaは四次構造は異なるものの分子系統的に見ると近い関係にあるため、酵素的および生理学的に同じ機能を有することは納得できる。*A. brasilense*の定量PCR

の解析の結果、この遺伝子は C3LHyp で誘導され、その破壊株では生育能が消失したことから、C3LHyp 代謝における重要な生理学的意義が証明された。また、同一の Pyr2C 還元酵素の関与する T3LHyp・D-プロリン・D-リジン代謝とも密接にリンクしていることが明らかとなった。

一方、タイプ IIb の *Aeropyrum pernix* の AcnX には C3LHyp 脱水酵素活性は見られず、機能解明は手詰まりとなった。ところが、2018 年にこの酵素が古細菌におけるメバロン酸代謝系の中でメバロン酸 5-リン酸脱水酵素として機能するという報告がなされた。メバロン酸 5-リン酸は C3LHyp とは構造的に類似せず、むしろアコニターゼ酵素の基質に近いことから驚いた。そこで、タイプ IIb として *Thermococcus kodakarensis* KOD1 のものを材料に、結晶化と立体構造解析を行うことにした（現在進行中）。

AcnX の立体構造決定

P. aeruginosa PA01 以外にもいくつかのタイプ I 酵素の大腸菌による発現系を構築し、組み換え酵素を用いて結晶化を試みた。この結果、*Agrobacterium tumefaciens* 由来のもので良質な結晶を得ることに成功した。この結晶は精製酵素と同様に茶色であり、活性中心に鉄イオンが保持されたホロ型であると考えられた。大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折データ収集、セレンメチオニンを利用した SAD 法により位相を決定し、最終的に 1.6 分解能での構造決定に成功した。予想外なことに、一次構造も基質構造も全く類似点がないのに、AcnX の立体構造は既知のアコニターゼ酵素と驚くほど似ていた。一方で、既知のアコニターゼ酵素が活性中心に [4Fe-4S] クラスタを保持しているのに対し、AcnX には予想外にも [2Fe-2S] クラスタが存在することが明らかになった。また、他のアコニターゼとの比較から AcnX の Ser70 が塩基触媒として C3LHyp の α -プロトンを引き抜く役割を担うことが示唆された。さらに、AcnX の Ser70Ala 不活性変異体と C3LHyp の共結晶を作製し、C3LHyp 結合型 AcnX の結晶構造を 2.0 分解能で決定した。C3LHyp の α -炭素は Ala70 の近くに位置し、3 位ヒドロキシ基は [2Fe-2S] クラスタの鉄原子に配位していた。以上のことから、AcnX の S70 により C3LHyp の α -プロトンが引き抜かれ、3 位ヒドロキシ基が [2Fe-2S] クラスタの鉄原子の一つに移る、という反応触媒機構が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yasunori Watanabe, Chinatsu Iga, Yasuo Watanabe, and Seiya Watanabe (2019) Structural insights into the catalytic and substrate recognition mechanisms of bacterial L-arabinose 1-dehydrogenase. *FEBS Letters* (in press)
2. Seiya Watanabe, Fumiyasu Fukumori, Yasuo Watanabe (2019) Substrate and metabolic promiscuities of D-altronate dehydratase family proteins involved in non-phosphorylative D-arabinose, sugar acid, L-galactose, and L-fucose pathways from bacteria. *Molecular Microbiology* (in press)
3. Yasunori Watanabe, Seiya Watanabe, Yoshika Itoh, Yasuo Watanabe (2019) Crystal structure of substrate-bound bifunctional proline racemase/hydroxyproline epimerase from a hyperthermophilic archaeon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 511(1), 135-140.
4. Seiya Watanabe, Fumiyasu Fukumori, Hisashi Nishiwaki, Yasuhiro Sakurai, Kunihiko Tajima, Yasuo Watanabe (2019) Novel non-phosphorylative pathway of pentose metabolism from bacteria. *Scientific Reports* 9(1) 155.
5. Seiya Watanabe, Daichi Morimoto, Fumiyasu Fukumori, Yasuo Watanabe (2018) Characterization of *cis*-4-hydroxy-D-proline dehydrogenase from *Sinorhizobium meliloti*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 82, 110-113.
6. Yasuo Watanabe, Itsuki Kobayashi, Takanori Ohnaka, Seiya Watanabe (2018) *In vitro* synthesis of phospholipids with yeast phospholipase B, a phospholipid deacylating enzyme. *Biotechnology Reports* 18, e00250.
7. Seiya Watanabe, Fumiyasu Fukumori, Mao Miyazaki, Shinya Tagami, Yasuo Watanabe (2017) Characterization of a novel *cis*-3-hydroxy-L-proline dehydratase and a *trans*-3-hydroxy-L-proline dehydratase from bacteria. *Journal of Bacteriology* 199, pii: e00255-17.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 渡辺誠也 機能未知タンパク質の新規アノテーション手法の開発と産業応用 2018 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演 島根大学松江キャンパス(2018 年 9 月 20 日)
2. 渡邊康紀, 渡辺誠也 生体膜主要リン脂質の生合成を担う PS 脱炭酸酵素の構造機能解析 2018 年度日本農芸化学会中四国支部会(第 52 回講演会) 島根大学松江キャンパス(2018 年 9 月 21 日)
3. 浦田健司, 渡邊康紀, 渡辺誠也 水草から単離されたセルラーゼ生産菌の同定とその酵素的性質の決定 2018 年度日本農芸化学会中四国支部会(第 52 回講演会) 島根大学松江キャンパス(2018 年 9 月 21 日)
4. 村瀬陽介, 渡邊康紀, 渡辺誠也 *cis*-3-ヒドロキシ-L-プロリン脱水酵素の X 線結晶構造

解析 2018 年度日本農芸化学会中四国支部会（第 52 回講演会）島根大学松江キャンパス（2018 年 9 月 21 日）

5. 伊賀千夏, 渡邊康紀, 渡辺誠也 L-アラビノース 1-脱水素酵素の構造解析 2018 年度日本農芸化学会中四国支部会(第 52 回講演会)島根大学松江キャンパス(2018 年 9 月 21 日)
6. 伊藤愛香, 渡邊康紀, 渡辺誠也 超好熱古細菌由来プロリンラセマーゼの構造機能解析 2018 年度日本農芸化学会中四国支部会（第 52 回講演会）島根大学松江キャンパス（2018 年 9 月 21 日）
7. 渡辺誠也 機能未知タンパク質の新たなアノテーション手法 日本農芸化学会 2017 年度大会（2017 年 3 月 19 日）
8. 泉咲綾, 青澤理恵, 家藤治幸, 原富次郎, 高塚由美子, 渡辺誠也 組み換えラッカーゼによる PCB 分解の検討 日本農芸化学会 2017 年度大会（2017 年 3 月 18 日）
9. 青澤理恵, 泉咲綾, 原富次郎, 高塚由美子, 渡辺誠也 変異型ピフェニルジオキシゲナーゼを用いた PCB 分解特性改変の検討 日本農芸化学会 2017 年度大会（2017 年 3 月 18 日）
10. Seiya Watanabe. Alternative metabolic pathways of pentoses and deoxysugars containing in plant materials by microorganisms. 農学先端研究国際フォーラム「フアイトジーンの可能性と未来 VIII」2016 年 10 月 17 日
11. Kazuaki Yamamoto, Seiya Watanabe, Michio Hagihara, Shuji Tohda. Development of a novel measurement method for L-hydroxyproline using a new enzyme. IFBLS2016（第 32 回世界医学検査学会（2016 年 9 月 3 日）
12. 渡辺誠也, 田嶋邦彦, 松井一直 電子スピン共鳴分析で明らかになったフラビン依存性オピン脱水素酵素に含まれる鉄硫黄クラスター 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会（例会）(2016 年 6 月 11 日)

〔図書〕(計 2 件)

1. Seiya Watanabe (2018) Dye-linked flavin-containing dehydrogenase from bacteria related to plant. *Symbiosis* InTechOpen (ISBN: 978-1-78923-225-7)
2. Seiya Watanabe (2017) Hydroxyproline Metabolism in Microorganisms. *The Handbook of Microbial Metabolism of Amino Acids* (Edited by J.P.F. D' Mello) CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International)(ISBN-10: 1780647239)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

〔その他〕

1. 2018 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞 渡辺誠也「機能未知タンパク質の新規アノテーション手法の開発と産業応用」(2018 年 9 月 20 日)

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田嶋邦彦教授（京都工芸繊維大学）

ローマ字氏名：Kunihiko Tajima

研究協力者氏名：福森文康教授（東洋大学）

ローマ字氏名：Fumiyasu Fukumori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。