

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18689

研究課題名(和文) 特異的農薬開発を指向した新規なL-アミノ酸脱水素酵素の機能解析

研究課題名(英文) Enzymological characterization of novel L-amino acid dehydrogenase for development of high specific agrochemicals

研究代表者

米田 一成 (YONEDA, Kazunari)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：00469397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物疫病菌のみに効果のある特異的農薬開発を目的としてL-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)遺伝子のクローニングを行った。大腸菌を用いてThrDH遺伝子を発現させた後、遺伝子発現産物の精製、活性測定を行った結果、NAD依存性ThrDH活性を有す事を明らかにした。SDS-PAGEで単一にまで精製した結果、酵素のサブユニット分子量は55 kDaでありアミノ酸配列から予測される分子量であった。また、N末端アミノ酸配列分析の結果、予測されるアミノ酸配列と一致した。本酵素はL-スレオニン、DL-3-ヒドロキシノルバリンのみを基質とし、L-システイン、N-アセチルグリシンが阻害剤になることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A gene encoding an L-Threonine dehydrogenase (ThrDH; PITG_05140) homologue was identified in the *Phytophthora infestans*. After transforming *E. coli* with pET-PITG_05140, an expression vector harboring the gene, the transformant cells exhibited a high level of L-ThrDH activity, and the enzyme was readily purified from the cells' crude extract in one simple step: Talon metal affinity chromatography. The purified enzyme showed a single protein band on SDS-PAGE, and its N-terminal sequence was determined to be SDKIIHLTDD. SDS-PAGE showed the subunit molecular mass of *P. infestans* ThrDH to be about 55 kDa, which is consistent with the molecular weight calculated from the amino acid sequence. Non-tagged *P. infestans* ThrDH acted on L-threonine and DL-3-hydroxynorvaline, and the enzyme was partially inhibited by L-cysteine and N-acetyl glycine.

研究分野：応用生物化学

キーワード：L-スレオニン酸脱水素酵素 酵素化学 結晶構造解析 植物疫病菌

1. 研究開始当初の背景

植物疫病菌制御を目的とした化学農薬には人体への影響と土壌環境汚染という2つの重大な問題点がある。これらの問題を解決するためには従来とは異なる考え方の疫病菌に特異性の高い選択性農薬の開発を行う必要があると考えられる。植物疫病菌でのみ働く重要な遺伝子の選抜をインシリコスクリーニングにより行った結果、*Phytophthora infestans* PITG_05140; L-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)が候補遺伝子に該当することを明らかにした。選抜のために詳細に調べた ThrDH 遺伝子の生物分布により、バクテリアで 297 遺伝子、ヒトや植物疫病菌などの真核生物で 39 遺伝子、アーキア(好熱菌)で 8 遺伝子が存在することを明らかにし、広い生物種で ThrDH が利用されていることが分かった。興味深いのは、植物では ThrDH 遺伝子は存在せず、また、ヒトの ThrDH 遺伝子は機能しない偽遺伝子となっており、L-スレオニンの代謝には ThrDH 以外の酵素が関与している点である。これは、植物疫病菌の宿主である植物やヒトと植物疫病菌である *P. infestans* とでは全く異なった経路により L-スレオニンが代謝されることを意味している。そのため、植物疫病菌の ThrDH は新規な農薬開発のための重要なターゲットとなりうると考えられる。

2. 研究の目的

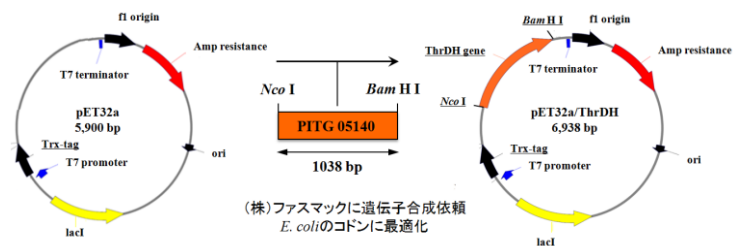
植物疫病菌はトマト及びジャガイモに感染し葉に暗褐色の病斑を作るだけでなく、果実を腐敗させる感染症であり、近年発生が増加している植物病害の1つである。また、疫病菌は防除が難しく、作柄に大きく影響する病害として恐れられている。現在使用できる農薬は限ら

れており、人体への影響や環境汚染の問題からも、疫病菌に特異性の高い選択性農薬の開発が急務となっている。本研究では植物疫病菌の L-スレオニン代謝に重要な役割をする「L-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)」に着目している。植物疫病菌から見出された新規なタイプの ThrDH を特異的に阻害する新しい農薬開発の基礎を築くことを目的として計画した。

3. 研究の方法

(1) ThrDH 遺伝子の発現系の構築

植物疫病菌由来 L-スレオニン脱水素酵素の機能を詳細に調べるためには、大量のタンパク質が必要となるため、クローニングにより目的タンパク質を大量に発現させた。植物疫病菌由来 L-スレオニン脱水素酵素をコードする遺伝子を大腸菌のコドンに最適化を(株)ファスマックに依頼したものを pET32a (チオレドキシシン融合タンパク質)にライゲーションした(図1)。すなわち、人工合成遺伝子(pUC/ThrDH)を *Nco* I、*Bam* HI で処理し、アガロースゲル電気泳動した後、目的の配列のバンドを切り出して抽出、精製し、少量の TE に溶解した。pET32a も同じ制限酵素で処理し、*P. infestans* ThrDH 遺伝子とライゲーションを行った。タンパク質発現用の宿主細胞は大腸菌 BL21-DE3 codon plus RIPL 株を用い、1 mM IPTG を添加する事により遺伝子の発現を行った。



【図1, 構築した ThrDH プラスミドベクター】

(2) ThrDH の精製

ThrDH の精製には TALON コバルトアフィニティーカラム (Clontech) を使用した。TALON コバルトアフィニティーカラムに 10 mM CoCl₂ を結合させ、pH 7.0 になるまで蒸留水を流しカラムを洗浄後、バッファーを流し平衡化を行った。その後、粗酵素をカラムにアブアイし、Abs280 が 0.01 以下になるまでカラムを洗浄した後、溶出バッファーを用いて溶出を行った。精製を行った後、透析バッファーを用いて 18 h、4°C で行った。カラムからの溶出はステップワイズ法 (50~300 mM イミダゾール) を行い、活性画分を回収した。発現及び、純度の検定には SDS-PAGE を用いた。精製時に宿主細胞由来のプロテアーゼによる酵素の切断を防ぐために EDTA フリーのインヒビターカクテルを使用した。

(3) 遠紫外円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

精製した ThrDH (0.1 mg/ml) を JASCO J600 を使用して遠紫外領域 (Far UV; 200-250 nm, セル長; 0.05 cm) における CD スペクトル測定を行った。

(4) ThrDH の活性測定

ThrDH の活性測定は波長 340 nm における NADH の増加量を分光光度計で測定した。NAD を除いた反応溶液 (100 mM グリシンバッファー pH 10.0、10 mM L-スレオニン、ThrDH、水) を混合した後、NAD (終濃度 1.25 mM) を加え、分光光度計を用いて、25°C における波長 340 nm の吸収の増加を 3 分間測定した。また、ThrDH 活性を定性的に検出するため、活性染色法 (PMS-MTT 系) も行った。

(5) トロンピンによるチオレドキシシタグの切断

トロンピンを用いて ThrDH とチオレドキシシタグの切断を行った。4°C で 4 日間切断後、トランスプロッティングおよび、N

末端アミノ酸配列分析を行うことで予測される部位で切断されているかを確認した。

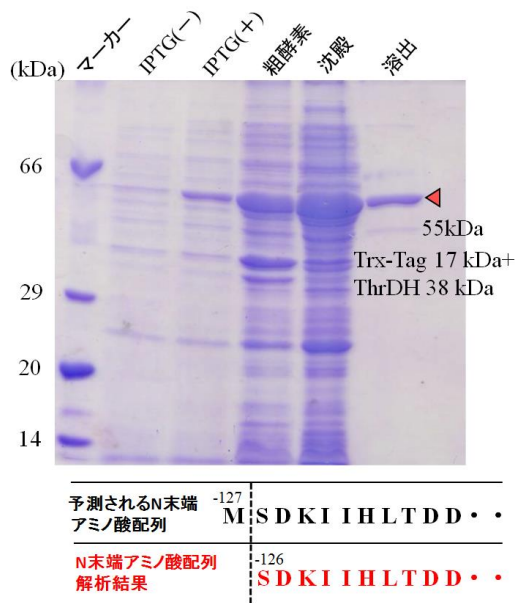
(6) ThrDH の結晶化

結晶化を行うため 5 mg/ml まで精製酵素の濃縮を行い、NAD を終濃度 1.0 mM になるように濃縮した酵素に加え、シッティングドロップ蒸気拡散法により酵素の結晶化を行った。結晶化スクリーニングには Crystal Screen, Crystal Screen2 (Hampton Research) を使用し 20°C で結晶化を行った。

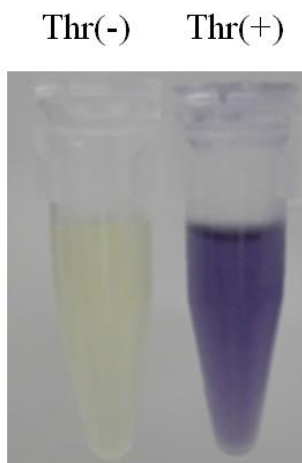
4. 研究成果

(1) ThrDH 遺伝子の発現・精製

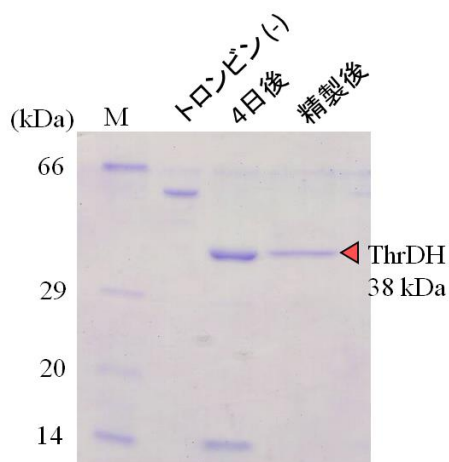
植物疫病菌由来 ThrDH の機能解析を目的として、合成遺伝子を大腸菌発現用ベクターである pET32a (チオレドキシシ融合タンパク質) に組み込み、宿主細胞である大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株を用いて IPTG による ThrDH 遺伝子の大量発現を行った後、His-tag アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った。その結果、目的酵素が大量に得られることが明らかになった (図 2)。発現チェックの結果、SDS-PAGE で予想される分子量 (55 kDa) にバンドが検出され、His-tag アフィニティークロマトグラフィーによる精製にも成功した。また、精製酵素の CD スペクトル測定を行った結果、タンパク質の α -ヘリックス構造に特徴的な 222 nm の負のピークが観察されたことから、立体構造を保った状態の ThrDH が単離できたと判断し、以後この酵素を用いて酵素の機能解析の実験を行った。



【図2, ThrDHの発現、精製、N末端アミノ酸配列解析の結果】



【図3, 活性染色法によるThrDH活性の確認】



【図4, トロンビンによるチオレドキシントグの切断、精製】

(2) ThrDH 遺伝子の活性測定・結晶化

活性染色の結果、基質であるL-スレオニン存在下でのみ活性が確認できたため(図3)、本酵素の基質特異性を分光光度計を用いて実験を行った。その結果、L-スレオニン以外に、DL-3-ヒドロキシノルバリンやピルビン酸に反応性を有することが明らかになった。また、阻害剤の探索を目的に活性測定を行ったところ、L-スレオニンのアナログであるL-システインだけでなく、N-アセチルグリシンが濃度依存的にThrDHを阻害する事が明らかになった。逆に、N-アセチルL-アラニン、N-アセチルL-ヒスチジン、N-アセチルイミダゾールは阻害ではなく酵素を活性化させるという現象を見出した。しかしながら、反応性のあった化合物であるピルビン酸は脱水素されるはずの水酸基が無く酵素反応が進むとは考えにくい。また、N-アセチル体のアミノ酸がThrDHを活性化することも考えにくいと思われた。

そこで、可溶性タグとしてN末端に付加しているチオレドキシシン(105アミノ酸;大腸菌由来)がThrDH活性に影響していると考えられたため、プロテアーゼであるトロンピンを用いてチオレドキシシンを切断し、再度精製を行うことで純粋なThrDHを得た(図4)。N末端のチオレドキシシンを除去した酵素は比活性が約4.5倍になるだけでなく、L-スレオニン、DL-3-ヒドロキシノルバリンのみを基質とし、L-システイン、N-アセチルグリシンが阻害剤になることを明らかにした。Crystal Screen, Crystal Screen2を用いた結晶化スクリーニングの結果、ThrDHの結晶は得られなかったため、今後さらなる酵素の結晶化スクリーニングを行う必要がある。これらの研究結果はThrDH阻害剤の設計を行う上で有用な情報となりうる。

2016年4月の熊本地震により東海大学農学部阿蘇校舎の研究室は使用不能になると共に、冷蔵、冷凍の試薬類や多くの機器類に被

害があった。地震後の約半年間は研究を行うことができなかったが、多くの方々のご協力により、研究体制を復旧させることができた。今後、特異的農薬開発を目的とした *P. infestans* ThrDH の立体構造解析を行うために高品質な結晶の作成を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T. Crystal structure of the NADP⁺ and tartrate-bound complex of L-serine 3-dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Extremophiles*. 査読有, Vol. 22, 2018, 395-405
- ② Yoneda K, Araki T. Gene cloning and preliminary enzymological characterization of a gene homologous to NAD⁺-dependent L-aspartate dehydrogenase. *Proceedings of School of Agriculture Tokai University*. 査読有, Vol. 37, 2018, 9-15
- ③ Hayashi J, Mutaguchi Y, Minemura Y, Nakagawa N, Yoneda K, Ohmori T, Ohshima T, Sakuraba H. Crystal structure of the novel amino-acid racemase isoleucine 2-epimerase from *Lactobacillus buchneri*. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 査読有, Vol. 73, 2017, 428-437
- ④ Hayashi J, Seto T, Akita H, Watanabe M, Hoshino T, Yoneda K, Ohshima T, Sakuraba H. Structure based engineering of an artificially generated NADP⁺-dependent d-amino acid dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 査読有, Vol. 83, 2017, e00491-17
- ⑤ Yoneda K, Fukuda Y, Araki T. Crystal structure analysis of extremely thermostable carbonyl reductase and structural basis for

substrate recognition. *Proceedings of School of Agriculture Tokai University*. 査読有, Vol. 36, 2017, 1-6

- ⑥ Nishiyama Y, Fukamizo T, Yoneda K, Araki T. Complete Amino Acid Sequence of a Copper/Zinc-Superoxide Dismutase from Ginger Rhizome. *Protein J*. 査読有, Vol. 36, 2017, 98-107
- ⑦ Hayashi J, Yamamoto K, Yoneda K, Ohshima T, Sakuraba H. Unique coenzyme binding mode of hyperthermophilic archaeal sn-glycerol-1-phosphate dehydrogenase from *Pyrobaculum calidifontis*. *Proteins*. 査読有, Vol. 84, 2016, 1786-1796
- ⑧ Fukuda Y, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T, Yoneda K. Catalytic properties and crystal structure of thermostable NAD(P)H-dependent carbonyl reductase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Enzyme and Microbial Technology*. 査読有, Vol. 91, 2016, 17-25

[学会発表] (計 4 件)

- ① 米田 一成、櫻庭 春彦、荒木 朋洋、大島 敏久、植物疫病菌由来 NAD(P)⁺依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能・構造解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学
- ② 米田 一成、三神 卓也、櫻庭 春彦、荒木 朋洋、大島 敏久、植物疫病菌由来 NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能解析、日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会、2017 年 9 月 22 日、大阪府立大学
- ③ 米田 一成、福田 雄大、櫻庭 春彦、荒木 朋洋、大島 敏久、ニワトリ脂肪肝由来 NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素の機能改変、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017 年 6 月 10 日、横浜市開港記

念会館

- ④ 米田 一成、福田 雄大、櫻庭 春彦、荒木 朋洋、大島 敏久、超好熱アーキア由来 NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素の分子特性、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日、富山国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kuma.u-tokai.ac.jp/~nougaku/Bio/yoneda/yoneda.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

米田 一成 (YONEDA, Kazunari)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：00469397