

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07514

研究課題名(和文) ツールとしての祖先型配列のキメラ解析への応用:トリプトファン分解酵素の分子進化

研究課題名(英文) Molecular evolution of tryptophan degrading enzymes.

研究代表者

湯浅 創 (Yuasa, Hajime)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・准教授

研究者番号：40322797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫の1種であるブレファリズマの4つのIDO(IDO-I～IV)に対して、IDO-Iと祖先型IDO-I/IV、IDO-IIIと祖先型IDO-II/IIIとのキメラ酵素シリーズの解析により、IDO-Iの5-ヒドロキシトリプトファンへの特異性は131番目のAsn、IDO-IIIのL-Trpに対する高い親和性は132番目のGluに起因することを突き止めた。

また、無脊椎動物の高触媒効率IDOにおいて、F2nd/G9thがTyr/Hisの組み合わせであることが重要、脊椎動物IDO1を含め、IDOの高触媒効率化は複数回起こったと目される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛虫BlepharismaのIDO-IはL-トリプトファン以外のインドール化合物に、より高い親和性を示す点で、他に例の無いIDOである。その基質特異性に関わるアミノ酸残基を特定(Asn131)したことは、IDOの分子進化を探る上で重要である。更に、予想祖先型配列のキメラ解析への応用が有効な手段であることも証明できた。また、IDOの高触媒効率化において、脊椎・無脊椎動物に共通してF2nd/G9thの2つの残基が重要であることが判明し、今後のトリプトファン分解酵素の研究発展に対し、重要な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The ciliate *Blepharisma* has four IDO genes and each IDO enzyme has a distinct enzymatic property. IDO-III has a high affinity for L-Trp, whereas the affinity of the other isoforms for L-Trp is low. Meanwhile, IDO-I shows a significant catalytic activity with another indole compound: 5-hydroxy-L-tryptophan. By analysing a series of chimeric enzymes based on extant and predicted ancestral enzymes, Asn131 in IDO-I and Glu132 in IDO-III were identified as the key residues responsible for their high affinity for each specific substrate.

The invertebrate IDOs generally show low catalytic efficiency for L-Trp. Meanwhile, two IDO isoforms from scallop (IDO-I and -III) and sponge IDOs show high L-Trp catalytic activity, which is comparable to vertebrate IDO1. Site-directed mutagenesis experiments have revealed that two residues, Tyr located at the 2nd residue on the F-helix (F2nd) and His located at G9th, are crucial for the high catalytic efficiency of these high performance invertebrate IDOs.

研究分野：分子進化

キーワード：トリプトファン分解酵素 分子進化 比較生化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) は、キヌレン経路において、トリプトファン (L-Trp) を N-ホルミルキヌレンへと変換する酵素である。祖先種における遺伝子重複により、脊椎動物では IDO1 と IDO2 の 2 つの遺伝子が存在している。IDO1 は主に哺乳類に見られ、L-Trp に対する触媒効率は非常に高い。IFN- γ により発現が誘導され、局所的に L-Trp 濃度を減少させることにより T 細胞の分裂を抑制する免疫抑制分子として近年特に注目されている。一方で、IDO2 は全ての脊椎動物で保存されているが、L-Trp に対する基質親和性・触媒効率は非常に低く、生理的機能は不明である。脊椎動物 IDO1/IDO2 の L-Trp に対する分解活性の違いの原因 (残基) は長らく未同定であったが、IDO1/IDO2 の比較生化学的解析、および筆者が開発した「祖先型配列を用いたキメラ解析」により、ヘムポケットに隣接する Tyr 残基 (F2nd: F-helix の 2 番目の Tyr 残基) と Ser 残基 (G9th: G-helix の 9 番目の Ser 残基) が原因であることが判明している。

IDO は無脊椎動物や真菌類、一部の細菌にもみられるが、その多くは脊椎動物 IDO2 様の低触媒効率酵素であり、機能は不明である。一方で、低触媒効率酵素の保存性は高く、何等かの生理的機能を有していることが示唆される。

2. 研究の目的

2017 年に繊毛虫 *Blepharisma* が 4 つの IDO (IDO-I~IV) を持つことが報告された。このうち、IDO-I は L-Trp ではなく、5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) 特異的な酵素であることが示された。また、IDO-III は L-Trp に対して高い基質親和性・触媒効率を示すものの、IDO-II、IDO-IV は低触媒効率 IDO であった。単一の生物種に多様な性質の IDO が存在していることから、IDO の分子進化を探るための良いモデルであり「祖先型配列を用いたキメラ解析」を用いて *Blepharisma* における IDO 多様化のメカニズムの解明を試みた。

一方、脊椎動物 IDO2 を含む低触媒効率 IDO の機能を探る一歩として、無脊椎動物 IDO を中心に、酵素活性と分子進化の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) *Blepharisma* IDOs の分子進化

分子系統樹から、*Blepharisma* IDOs は連続した 2 回の遺伝子重複によって生じた事が示唆された。IDO-I と IDO-IV は 66.8% のアミノ酸一致率を示すが、祖先型 IDO-I/IV とより高い一致率を示した (85.2% と 81.1%)。また、祖先型 IDO-I/IV は (IDO-I にのみ見られる) 5-HTP への特異性は示さなかった。よって、IDO-I と祖先型 IDO-I/IV との間でキメラ酵素を作成、5-HTP 特異性に関わるアミノ酸残基の特定を試みた。同様に、IDO-II と IDO-III は 52.6% のアミノ酸一致率を示すが、祖先型 IDO-II/III とより高い一致率を示した (72.2% と 75.6%)。他方、祖先型 IDO-II/III の L-Trp に対する K_m 値は 27.3 mM と、IDO-III ($K_m = 589 \mu\text{M}$) に比較して非常に高い値を示した。よって、IDO-III と祖先型 IDO-II/III との間でキメラ酵素を作成、L-Trp に対する高い親和性に関わるアミノ酸残基の特定を試みた (図 1 参照)。

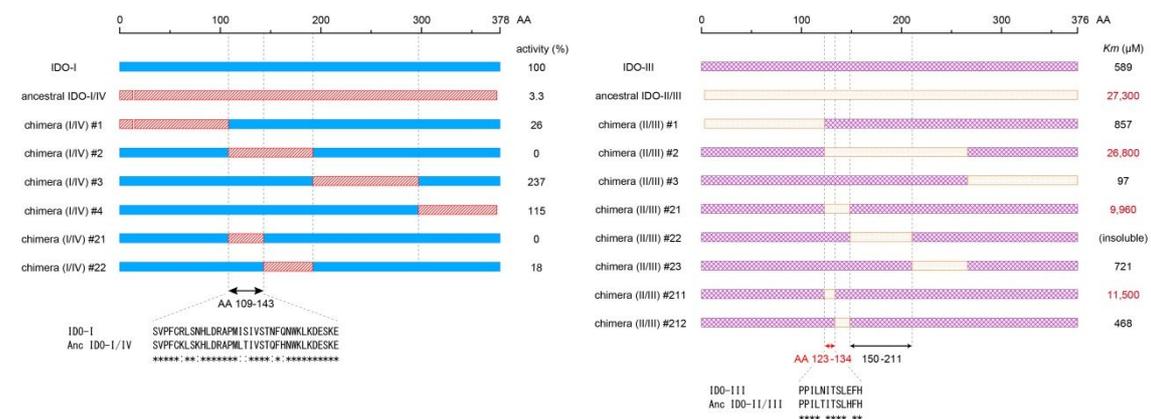


図 1 (左) IDO-I と祖先型 IDO-I/IV 間のキメラ酵素の模式図
(右) IDO-III と祖先型 IDO-II/III 間のキメラ酵素の模式図

(2) 無脊椎動物 IDO の分子進化

7 生物門 9 種の無脊椎動物に見られる 15 種の IDO 遺伝子について、大腸菌発現系を用いて組換え体を作成、それらの酵素パラメータ (k_{cat} , K_m) を決定した。また、6 つの IDO について、F2nd と G9th に着目し、それらの変異体の酵素パラメータの変化を調べた。

一方で、IDO と同じ反応を触媒するトリプトファン 2,3-ジオキシゲナーゼ (TDO) についても、脊椎動物から細菌までを含む 13 の生物種について詳細な酵素パラメータを決定した。

4. 研究成果

(1) *Blepharisma* IDOs の分子進化

祖先型配列を用いたキメラ解析により、IDO-I の 5-HTP への特異性は Asn131 によりもたらされていることが判明した。更に、5-HTP への特異性を示さない IDO-IV や祖先型 IDO-I/IV、他種 (*Stentor coeruleus*) 繊毛虫の IDO において、対応残基を Asn に置換すると、5-HTP に対する高い触媒能が観察された。即ち、繊毛虫 IDO において、L-Trp から 5-HTP への特異性の変化は、僅か 1 残基のアミノ酸の置換で起こったと考えられる。同様の解析により、IDO-III の L-Trp に対する高い親和性は、Glu132 によりもたらされていることが判明した。興味深いことに、繊毛虫 IDOs のアラインメントにおいて、IDO-I の Asn131 と IDO-III の Glu132 は同じ位置に整列され、この位置のアミノ酸残基を基質決定残基 (SDR: Substrate Determining Residue) と名付けた。繊毛虫 IDO では、基質特異性は SDR 1 残基にてほぼ決定されていると考えられる。繊毛虫 IDO の立体構造は未決定であるが、アラインメント上では脊椎動物 IDO の F2nd と 4 残基離れて位置している。アミノ酸 4 残基はほぼ α -ヘリックス 1 巻きに相当し、SDR はヒト IDO1 の Tyr126 同様、ヘムポケットに隣接していることが予想される (Yuasa HJ, Sugiura M, Harumoto T, 2018, *Arch. Biochem. Biophys.* **640**, 1-9)。

(2) 無脊椎動物 IDO の分子進化

TDO は四量体からなる酵素である。ヒトや細菌類の TDO では第二の基質結合部位が報告されていたものの、アロステリック効果はこれまで観察されていなかった。今回、13 種の TDO を詳細に解析することにより、脊椎動物 TDO では見いだされなかったが、無脊椎動物や細菌類の TDO はアロステリック効果 (Hill 係数: 1.37 ~ 2.31) を示す事が示された。また、TDO においても、メチレンブルー/アスコルビン酸による還元系は酵素活性を促進させることも示された。無脊椎動物 IDO の多くは mM オーダーの K_m 値を示す低触媒効率酵素であるが、カイメン (*Amphimedon queenslandica*) とホタテガイにおいて、脊椎動物 IDO1 に匹敵する基質親和性と触媒効率を示す IDO が見いだされた (図 2)。

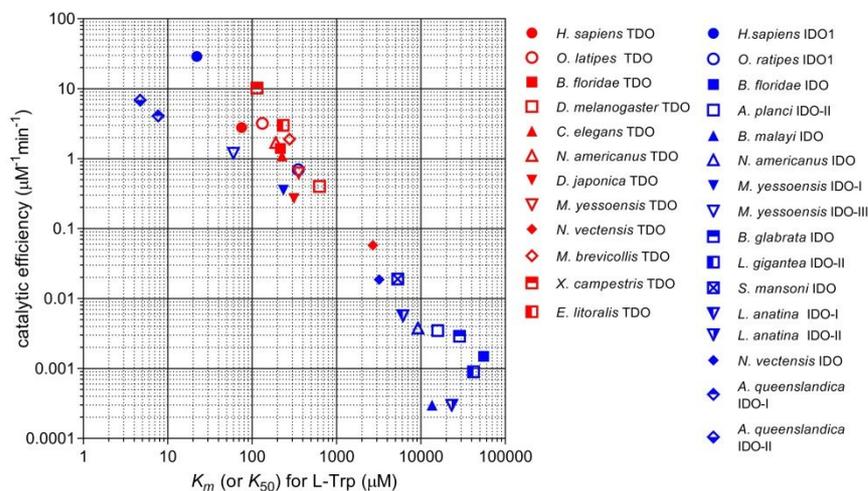


図 2 IDO と TDO の酵素パラメータ (k_{cat} , K_m) の分布

分子系統解析から、これらの高触媒効率 IDO は独立に進化したことが示された。IDO はその分子進化過程において、少なくとも 4 回 (真菌類、カイメン、ホタテガイ、脊椎動物 IDO1) 高触媒効率化したことが明らかになった。真菌類とカイメンには、TDO が見いだされないことから、TDO の代替酵素として IDO の高触媒効率化が起こったのかもしれない。これら無脊椎動物における高触媒効率 IDO では、F2nd の Tyr と G9th の His が (高い基質親和性/酵素活性に) 重要である。このアミノ酸残基の配置は TDO と同様のものであり、また、幾つかの低触媒効率 IDO で対応残基を Tyr/His に置換すると、基質親和性/酵素活性共に著しく向上することが示された。IDO の高効率化には脊椎/無脊椎を問わず F2nd と G9th の 2 つの残基が重要であり、TDO と IDO の活性中心は、これまで考えられてきた以上に互いに似ていると言える (Yuasa HJ, 2020, *Biochim. Biophys. Acta* **1868**, article #140247)。

(3) 低触媒効率 IDO の機能

当初は近位 His を置換し、ヘムを結合できない変異体をネガティブ・コントロールとし、出芽酵母発現系で培養後の成分をメタボローム解析により網羅的に解析、低触媒効率 IDO の候補基質と反応生成物の絞り込みを行う計画であったが、資金の面から断念した。一方で、IDO2 の自動酸化速度、および活性化三量体 ($\text{IDO2}(\text{Fe}^{2+})\text{-L-Trp-O}_2$) のターンオーバー数の測定から、新たな展開が見えてきた。IDO2 活性化三量体は IDO1 と異なり、反応に伴う自動酸化は起こらず、還元剤非存在下でジオキシゲナーゼ反応を繰り返すことができる。更に、ネガティブ・コントロールとして用いた $\text{IDO2}(\text{Fe}^{3+})$ でも、還元剤非存在下でジオキシゲナーゼ反応が確認された。興味深いことに、反応速度は遅いものの、マウス $\text{IDO2}(\text{Fe}^{3+})$ の K_m 値は約 0.3 mM と劇的に低下し (基質親和性が向上)、生理的な L-Trp 濃度では $\text{IDO2}(\text{Fe}^{2+})$ の反応速度を凌駕する。魚類から哺乳類まで、他生物種 IDO2 においても同様の結果が観察されることから、IDO2 は Fe^{3+}

型で働くことを前提として進化してきた酵素であると考えられる。IDO2(Fe^{3+})が還元剤非存在下でジオキシゲナーゼ反応を行う分子メカニズムに関しては現時点では不明であるが、 CN^- で反応が阻害されることから、IDO ではヘム鉄が Fe^{3+} の状態でも、 O_2 が弱く結合できるのではないかと考えられる。ヘム鉄が酸化された状態でのジオキシゲナーゼ反応は TDO でも報告されている。本件にかかる研究は、これまで信じられて来たヘムタンパク質の酸素結合における常識を覆す可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuasa Hajime J., Sugiura Mayumi, Harumoto Terue	4. 巻 640
2. 論文標題 A single amino acid residue regulates the substrate affinity and specificity of indoleamine 2,3-dioxygenase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2017.12.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuasa Hajime J.	4. 巻 1868
2. 論文標題 A Comprehensive Comparison of the Metazoan Tryptophan Degrading Enzymes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta_Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2019.06.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hajime Julie YUASA（湯浅 創）
2. 発表標題 Molecular Evolution of Tryptophan-degrading Enzymes.
3. 学会等名 The 15th International Society for Tryptophan Research Conference (ISTRYP2018)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯浅 創
2. 発表標題 トリプトファン分解酵素の分子進化の新局面 X
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯浅 創
2. 発表標題 ツールとしての祖先型配列：キメラ解析への応用
3. 学会等名 第19回日本進化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯浅 創, 杉浦 真由美, 春本 晃江
2. 発表標題 トリプトファン分解酵素の分子進化の新局面 IX
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会 (2017年度 生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯浅 創
2. 発表標題 トリプトファン分解酵素の分子進化の新局面 XI
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----