

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570161

研究課題名(和文) 補酵素 B12 関与ラジカル酵素の活性維持システムの動作原理の解明

研究課題名(英文) Studies of action mechanisms of molecular machineries for maintaining activity of coenzyme B12-dependent radical enzymes

研究代表者

森 光一 (Mori, Koichi)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：50379715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：ビタミンB12は生体内で補酵素型に変換され酵素反応に関与する。補酵素B12関与酵素は反応にラジカルを利用し、一般的な酵素では困難な反応を触媒可能である。その反面、副反応による不活性化を受けやすい。これに対して、いくつかの酵素には不活性化された酵素を再活性化する系が存在する。ヒトでは補酵素B12関与酵素の機能不全は代謝異常症につながる。また、工業生産への利用では酵素の不活性化は大きな問題となる。さらに、ビタミンB12は希少化合物であり、効率的な利用が求められる。本課題では、補酵素B12関与酵素の活性維持システムを明らかにするために、再活性化蛋白質や補酵素B12再生酵素などを対象に研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Vitamin B12 is biologically converted to the coenzyme form, and participate in enzyme reactions. Coenzyme B12-dependent enzymes catalyze enzymatically difficult reactions by radical mechanism. On the other hand, coenzyme B12-dependent enzymes tend to inactivate accompanying side reactions. In order to overcome such inactivation, several coenzyme B12-dependent enzymes have specific reactivating system for an inactivated enzyme. In human, a malfunction of a coenzyme B12-dependent enzyme leads to metabolic disorder. Also, inactivation of enzyme will be a serious problem when it applied to industrial production. Furthermore, since vitamin B12 is a rare compound, efficient use is desired. In this research project, we studied on proteins that participate in reactivation of coenzyme B12-dependent enzymes and recycling of coenzyme B12 in order to elucidate systems that maintain catalytic activity of coenzyme B12-dependent radical enzymes.

研究分野：生化学

キーワード：ビタミンB12 補酵素B12 ラジカル触媒酵素 再活性化因子 再活性化蛋白質 メチルマロン酸尿症 B12アデノシル化酵素 酵素反応機構

1. 研究開始当初の背景

補酵素 B₁₂ 関与酵素は、触媒機構の研究が精力的に行われ、生化学的研究に加え、遺伝子工学および構造生物学的研究によって、分子レベルでの理解が飛躍的に進んだ。当グループを中心に研究を行ってきたジオールデヒドラターゼ (DD) についても同様であり、触媒機構や不活性化機構の詳細を明らかにすることが出来た。一方、不活性化された補酵素 B₁₂ 関与酵素の再活性化蛋白質は、当研究室でジオールデヒドラターゼ再活性化因子 (DDR)、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子 (GDR)、エタノールアミンアンモニアリアーゼ再活性化因子 (EALR) を発見し、このうち、DDR については立体構造解析まで行っていた。しかし、DDR の作用機構が完全に解明されたわけではなく、EALR に関しては不明な点が多く残されていた。ヒトの補酵素 B₁₂ 関与酵素であるメチルマロニル CoA ムターゼ (MCM) の再活性化因子については不明であったが、当グループで大腸菌の MCM ホモログである Sbm の再活性化を検討し、YgfD 蛋白質が再活性化因子として機能することを示唆する結果を得ていた。また、ビタミン B₁₂ から補酵素 B₁₂ への変換を行う B₁₂ アデノシル化酵素はすでに3つのタイプが報告されていたが、不活性化された補酵素 B₁₂ 関与酵素の再活性化システムへの関与については調べられていなかった。

2. 研究の目的

補酵素 B₁₂ 関与酵素はラジカル機構で反応を触媒するが、ラジカルの反応性が原因でホロ酵素の不活性化を受けやすい。当研究グループでは、不活性化された補酵素 B₁₂ 関与酵素の再活性化蛋白質の一つである DDR の作用機構に関する研究を行ってきており、本課題でもそれを発展させ、アミノ酸残基レベルで作用機構を明らかにすることを目的とした。また、ヒト MCM の再活性化因子の候補として MMAA 蛋白質 (大腸菌 YgfD のヒトホモログ) を検討し、再活性化機能の有無や作用機構を明らかにすることも目的とした。さらに、EALR の作用機構を明らかにし、これらの結果により、補酵素 B₁₂ 関与ラジカル酵素の再活性化システムについての共通原理や差異を明らかにすることを目的とした。DDR の場合、不活性化されたホロ酵素の再活性化は、酵素に固く結合している不活性化損傷補酵素を酵素から解離させることによって行うことが分かっている。ビタミン B₁₂ は自然界でも希少な化合物であることから、この損傷補酵素を活性化補酵素 B₁₂ に再生する系が存在するはずであると考え、3種類の既知の B₁₂ アデノシル化酵素について、不活性化されたホロ酵素の再活性化系との関わりを明らかにすることとした。これらの結果

により、補酵素 B₁₂ 関与ラジカル酵素の再活性化や補酵素 B₁₂ の再生による活性維持システムの全体像を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 補酵素 B₁₂ 関与ラジカル酵素の再活性化蛋白質に関する研究

DDR の作用機構に関する研究

DDR による DD の再活性化における DDR 側および DD 側のアミノ酸残基の重要性や役割を明らかにするために、部位特異的にアミノ酸変異を導入した DDR および DD を作成した。これらの変異型蛋白質や野生型蛋白質を精製し、それらを用いて再活性化や、DD-DDR 複合体形成に対するアミノ酸変異の影響を調べた。

ヒト MCM に対する MMAA の作用に関する研究

機能解析に必要なヒト MCM および MMAA の精製蛋白質を大量に得ることを目的として、大腸菌を用いたヒト MCM および MMAA の発現系の構築を行った。発現したヒト MCM や MMAA を精製し、MCM の酵素活性や MMAA が有するグアノシン三リン酸加水分解酵素 (GTP アーゼ) 活性の測定を行った。また、部位特異的にアミノ酸変異を導入した MMAA を作成し、GTP アーゼ活性に対する影響を調べた。

EALR の作用機構に関する研究

エタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL) およびその再活性化因子である EALR (EutA) の精製蛋白質を用いて EAL-EALR 複合体が形成される条件を調べた。条件としては、EALR による EAL の再活性化にはアデノシン三リン酸 (ATP) が必要なことや DDR, GDR との類推から ATP 存在下やアデノシン二リン酸 (ADP) 存在下を検討した。

(2) 補酵素 B₁₂ の再生に関わる酵素に関する研究

DD の不活性化過程で生成する損傷補酵素は DDR による再活性化で DD から遊離する。この損傷補酵素からの補酵素 B₁₂ の再生に関与する可能性のある B₁₂ 還元酵素 (PduS) および3種類の B₁₂ アデノシル化酵素 (PduO, CobA, EutT) について、ビタミン B₁₂ から補酵素 B₁₂ への変換や、DD/DDR 系とリンクさせた条件での補酵素 B₁₂ の再生を検討することで、DD 再活性化系への補酵素 B₁₂ 再生系の関与を調べた。

(3) 補酵素 B₁₂ 関与ラジカル酵素の触媒機構に関する研究

EAL の作用機構に関する研究

補酵素 B₁₂ 関与酵素はラジカル機構で反応を触媒する。ラジカルは非常に反応性が高いため、酵素はラジカルの反応性を適切にコン

トロールしないと触媒活性を維持出来ない。EAL の触媒部位アミノ酸に変異を導入した変異型酵素を作成し、酵素活性や不活性化への影響を検討することで、これらのアミノ酸残基の触媒機構や酵素活性の維持に対する重要性や役割を調べた。

補酵素 B₁₂ 関与グリセロールデヒドラーゼ (GD) 類似酵素に関する研究

生理的反応条件下での補酵素 B₁₂ 関与酵素の不活性化の中で最も顕著な例は、GD や DD のグリセロール脱水反応下での不活性化である。GD や DD は 1,3-プロパンジオール(トリメチレングリコール)の工業生産に利用されており、この場合の基質はグリセロールである。したがって GD や DD の不活性化は大きな問題となる。そこで、不活性化などに対する特徴が既知の GD や DD とは異なる可能性があると考え、サブユニット構造や一部の基質結合アミノ酸が既知の GD や DD と異なると予想される根粒菌由来 GD 類似酵素を取り上げ、調べることにした。大腸菌発現系の構築や蛋白質精製を行い、酵素活性、基質特異性、不活性化などについて調べた。

4. 研究成果

(1) 補酵素 B₁₂ 関与ラジカル酵素の再活性化因子に関する研究

DDR の作用機構に関する研究

以前の生化学的および構造生物学的研究の結果から、DDR は ATP 加水分解酵素(ATP アーゼ)活性を有することや、DD の再活性化には DD-DDR 複合体の形成が重要であることが分かっていた。これらの機能に重要であると予想された DDR 側および DD 側のアミノ酸に変異を導入した変異型蛋白質を用いて影響を調べた結果、DDR 側で機能に重要な部位は2つあることが分かった。1つは DDR の サブユニットと サブユニットの界面に存在するマグネシウムイオン結合部位であり、DDR のサブユニット間の相互作用だけでなく、DD, DDR 間のサブユニットスワッピングを伴う DD-DDR 複合体の形成にも重要であることが明らかになった。もう1つは DDR の構造解析で明らかになっていた ADP 結合部位であり、ATP アーゼ活性だけでなく、DD-DDR 複合体の形成をコントロールするヌクレオチドスイッチの機能にも重要であることが明らかとなった。また、DDR の サブユニットとアミノ酸配列および立体構造に一部が類似している DD の サブユニットで、DD, DDR 間のサブユニットスワッピングに重要なアミノ酸残基を明らかにすることも出来た。

ヒト MCM に対する MMAA の作用に関する研究

MCM に対する MMAA の機能解析を行うには精製 MCM と MMAA 必要である。そこで、大腸菌を用いたヒト MCM および MMAA

の発現系を構築した。大腸菌でヒト MCM を発現させると不溶性の沈殿となったので、可溶性発現のために様々な検討を行った。その中で、トリガーファクター(TF)との融合蛋白質として低温で発現させた場合に少量ながら、可溶性発現に成功した。TF-MCM 融合蛋白質は酵素活性が低かったが、TF 部分を切除することで、予想されるレベルの酵素活性に上昇した。MMAA に関しては単独での可溶性発現と蛋白精製に成功した。MMAA の遺伝子変異がヒトのメチルマロン酸尿症の原因の1つであることが分かっているので、対応するアミノ酸に変異を導入した変異型 MMAA を作成した。MCM 存在下、非存在下で MMAA の GTP アーゼに対する変異の影響を検討した結果、MMAA 単独では変異型 MMAA の GTP アーゼ活性は野生型とあまり変わらなかったが、MCM 存在下では野生型 MMAA の GTP アーゼ活性の大幅な低下が見られた。変異型 MMAA ではそのような低下は見られなかったことから、MMAA の変異によって、MCM との相互作用に変化が生じた可能性が示唆された。十分な機能解析を行えるだけの量の精製 MCM を得ることが出来なかったので詳細は未解明であるが、以前に大腸菌 Sbm (MCM ホモログ)と YgfD (MMAA ホモログ)を用いて行った研究で YgfD が Sbm の再活性化因子として機能することを示す結果が得られているので、MMAA もヒト MCM の再活性化能を有するものと考えられる。

EALR の作用機構に関する研究

EAL と EALR が ATP 存在下で複合体を形成することを確認した。この結果は、ADP 結合型のときに対象の酵素と複合体を形成する DDR や GDR の場合とは対照的である。しかし、ATP 結合型と ADP 結合型で対象の酵素に対する親和性を変化させるヌクレオチドスイッチ機構を用いているという点は EALR も DDR や GDR と共通していることが分かった。

(2) 補酵素 B₁₂ の再生に関わる酵素に関する研究

Klebsiella oxytoca の DD/DDR 系 (= DD 再活性化系)における B₁₂ アデノシル化酵素の機能比較を行い、本菌が有する CobA, PduO, EutA の3種類の B₁₂ アデノシル化酵素の中で、CobA と PduO が DD 再活性化系における B₁₂ アデノシル化活性が高いことを明らかにした。一方、単独での B₁₂ アデノシル化活性は PduO が最も低かったことから、PduO は DD 再活性化系に特化した B₁₂ アデノシル化酵素であることが分かった。PduO は DD や DDR と同じ pdu オペロンにコードされていることから DD または DDR との相互作用によって DD 再活性化系での補酵素 B₁₂ 再生を効率的に行っているものと考えられる。同様に、EutA は EAL と同じ eut オペロンにコードされていることから、EAL の再

活性化にリンクした B₁₂ アデノシル化酵素である可能性が考えられる。また *Klebsiella pneumoniae* の GD 遺伝子が存在する *dha* レギュロンにコードされる PduO 類似蛋白質が B₁₂ アデノシル化酵素活性をもつことを確認した。この酵素は GD の再活性化にリンクした B₁₂ アデノシル化酵素である可能性が高いと考えられる。

(3) 補酵素 B₁₂ 関与ラジカル酵素の触媒機構に関する研究

EAL の触媒機構に関する研究

EAL の基質結合部位を形成する サブユニットの 5 つのアミノ酸残基に様々な変異を導入した変異型酵素を作成し、酵素活性や不活性化に対する影響を調べた。その結果、いずれの残基も触媒活性に必須であることが分かった。また、酵素反応中の補酵素 B₁₂ の吸収スペクトル測定や電子スピン共鳴スペクトル測定などを行い、補酵素 B₁₂ の Co-C 結合の活性化や反応中間体の安定化など、触媒活性やその維持における個々のアミノ酸残基の機能や重要性を明らかにした。

補酵素 B₁₂ 関与 GD 類似酵素に関する研究

低不活性化型 GD を取得することを目的として、サブユニット構造や活性部位アミノ酸の一部が既知の GD やとは異なる特徴をもつ根粒菌由来 GD 類似酵素について大腸菌発現系の構築を行い、蛋白精製および機能解析を行った。その結果、本酵素はグリセロールに対する活性を示さなかったが、既知の GD や DD が基質として利用できない化合物を基質として利用可能なことが示された。したがって、本酵素は、補酵素 B₁₂ の関与のもとに GD や DD とは異なる反応を触媒する新奇酵素であると考えられる。本酵素と既知の GD や DD を比較することで、GD や DD の基質特異性の改変や不活性化抵抗性の付与などに有用な情報が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Tetsuo Toraya, Aya Tanokuchi, Ai Yamasaki, Takehiro Nakamura, Kenichi Ogura, Takamasa Tobimatsu. Diol dehydratase-activase is essential for recycling of coenzyme B₁₂ in diol dehydratase. *Biochemistry*, 査読あり, Vol. 55, No. 1, 2016, pp. 69-78.
DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01023

Naoki Shibata, Tetsuo Toraya. Molecular architectures and functions of radical enzymes and their (re)activating proteins. *Journal of Biochemistry*, 査読あり, Vol. 158, No. 4, 2015, pp. 271-292.
DOI: 10.1093/jb/mvv078

Koichi Mori, Toshihiro Oiwa, Satoshi Kawaguchi, Kyosuke Kondo, Yusuke Takahashi, Tetsuo Toraya. Catalytic roles of substrate-binding residues in coenzyme B₁₂-dependent ethanalamine ammonia-lyase. *Biochemistry*, 査読あり, Vol. 53, No. 16, 2014, pp. 2661-2671.
DOI: 10.1021/bi500223k

Tetsuo Toraya. Cobalamin-dependent dehydratases and a deaminase: radical catalysis and reactivating chaperones. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 査読あり, Vol. 544, 2014, pp. 40-57.
DOI: 10.1016/j.abb.2013.11.002

Koichi Mori, Koji Obayashi, Yasuhiro Hosokawa, Akina Yamamoto, Mayumi Yano, Toshiyuki Yoshinaga, Tetsuo Toraya. Essential roles of nucleotide-switch and metal-coordinating residues for chaperone function of diol dehydratase-activase. *Biochemistry*, 査読あり, Vol. 52, No. 48, 2013, pp. 8677-8686.
DOI: 10.1021/bi401290j

〔学会発表〕(計 10 件)

齊藤 拓也, *Klebsiella oxytoca pdu* オペロンを発現させた大腸菌組換え体の機能解析. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月3日~12月4日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

仙波 和崇, 根粒菌由来 B₁₂ 補酵素関与新奇デヒドラターゼの酵素機能の解明. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月3日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

飛松 孝正, 補酵素 B₁₂ 関与ジオールデヒドラターゼの および サブユニットの N 末端領域間の相互作用. ビタミン B 研究委員会第 439 回研究協議会, 2015年2月7日, キャンパス・イノベーションセンター東京 (東京都港区)

森 光二, B₁₂ 補酵素関与エタノールアミンアンモニアラーゼにおける活性部位アミノ酸残基の役割. ビタミン B 研究委員会第 438 回研究協議会, 2014年11月22日, 大阪工業大学うめきたナレッジセンター (大阪府大阪市)

飛松 孝正, 補酵素 B₁₂ 関与ジオールデヒドラターゼの低溶解性決定部位を用いた画期的なタンパク質精製法. ビタミン B 研究委員会第 438 回研究協議会, 2014年11月22日, 大阪工業大学うめきたナレッジセンター (大阪府大阪市)

河本 聖也, 細菌 *pdu* 多面体オルガネラ酵素の補酵素 B₁₂ 関与ジオールデヒドラターゼと *pdu* オルガネラの他の酵素との相互作用の解析. 第 87 回日本生化学会大会, 2014年10月17日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

山本祐也, 補酵素 B₁₂ 関与 diol dehydratase の低溶解性部位を用いる可溶性二量体酵素の簡便かつ高収率な精製法の開発. 第 87 回日本生化学会大会, 2014年10月17日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

平田 佳久, 細菌*pdu*多面体オルガネラの主要酵素であるジオールデヒドラターゼがもつ低溶解性化決定領域間の相互作用の解析. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月17日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

森 光一, ビタミンB₁₂補酵素関与エタノールアミンアンモニリアーゼの基質結合アミノ酸残基の機能解析. 日本ビタミン学会第65回大会, 2013年05月18日, 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区)

山崎 藍, 3種類の*Klebsiella oxytoca*コバラムイン・アデノシルトランスフェラーゼに関する酵素化学的研究. 日本ビタミン学会第65回大会, 2013年05月18日, 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区)

〔その他〕

プレスリリース (岡山大学)

http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id143.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 光一 (MORI, Koichi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号: 50379715

(2) 研究分担者

飛松 孝正 (TOBIMATSU, Takamasa)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 30188768

(3) 連携研究者

虎谷 哲夫 (TORAYA, Tetsuo)

岡山大学・名誉教授

研究者番号: 70026318