

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580136

研究課題名(和文) 超好熱性古細菌の中央代謝系酵素の研究

研究課題名(英文) Studies on the enzymes related to central metabolism of hyperthermophilic archaea

研究代表者

若木 高善 (Wakagi, Takayoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・研究員

研究者番号：70175058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好酸超好熱性古細菌の中央代謝経路に見られるいくつかの特異な酵素の構造機能相関を解明した。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のうち通常生物にも見られるリン酸化型GAPDHと本菌特有の非リン酸化型GAPNとについて基本的性質を明らかにし、さらに、GAPNの1アミノ酸の変異によってアロステリズムがK型からV型に変換されることを明らかにした。

また、解糖系酵素グリセルアルデヒド酸化還元酵素には三種類のアイソザイムがあり、特異なサブユニット構築法によって形成されていることを示し、2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素の立体構造解明等により特異な反応機構を明らかにした。また酵素FNRを同定した。

研究成果の概要(英文)：Structure-function relationships of several enzymes related to central metabolism of acidophilic and hyperthermophilic archaeon were investigated. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases including traditional phosphorylating type GAPDH and non-phosphorylating enzyme GAPN were characterized. Single amino acid substitution of GAPN resulted in conversion of the allosterism type from K into V.

Three isozymes of glyceraldehyde oxidoreductase related to glycolysis were isolated. They showed novel subunit compositions and the crystal structure suggested characteristic molecular construction pathway.

2-Oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from the organism has only one iron-sulfur cluster ligated by 4 Cys. Substitution of Cys and X-ray crystallography suggested a novel reaction mechanism. Ferredoxin NADP(+) reductase was identified by analyzing ST2133.

研究分野：酵素学

キーワード：酵素 酸化還元酵素 古細菌 超好熱菌 フェレドキシン アロステリズム 中央代謝 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

超好熱菌の特長の一つに、真正細菌や真核生物とは異なる特異で原始的な代謝系を有することがあげられる。この特異な代謝系の全貌は、多くの先行研究があるにもかかわらず、まだまだ未知の点が多い。我々はこれまでに、超好熱菌の解糖系/糖新生系・クエン酸回路のような中央代謝に注目して、特徴的な酵素の構造・機能相関を解明してきた。とくに、二機能性フルクトースビスリン酸アルドラーゼ/ホスファターゼの触媒機構の解明は、酵素の活性中心の変換の例として注目される。さらに、超好熱菌の変形エントナ・ドウドロフ解糖経路で働く、特長的な酵素でありながら、従来十分な研究が行われなかったものなどを調べることで、特異な酵素であるがゆえの新たな酵素学的・蛋白科学的な知見を得ることができると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、解糖系等で働くグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) グリセルアルデヒド酸化還元酵素 (GAOR) クエン酸回路の入口や内部で働く 2-オキソ酸:フェレドキシン酸化還元酵素 (OFOR) を主要な対象として、構造・機能相関の解明を目指した。いずれも超好熱菌の糖代謝・エネルギー代謝にかかわる酸化還元酵素であるが、他方、超好熱菌では電子伝達体として NAD⁺よりもフェレドキシンを用いる例があり、これに関連して、従来未知のフェレドキシン:NADP⁺還元酵素 (FNR) に注目し、その同定と蛋白質の構造機能相関の解明を目指す。

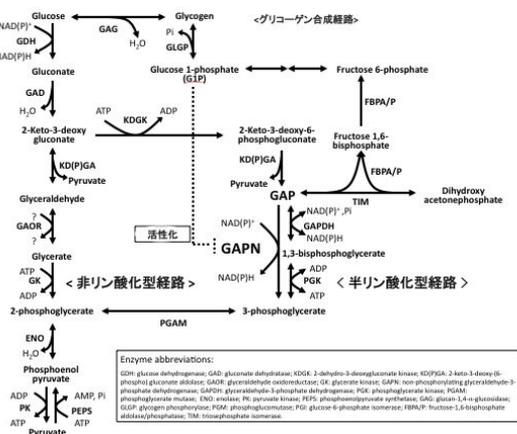


図 1. *S. tokodaii* の変形エントナ・ドウドロフ解糖経路

3. 研究の方法

材料として好酸好熱性古細菌スルホロバス・トコダイ *Sulfolobus tokodaii* を用いた。この菌では解糖系は非リン酸化型の ED 経路であり、グルコースはリン酸化されることなくグリセルアルデヒド (GA) に変換され、GA はそのまま酸化される経路と、リン酸化されてグリセルアルデヒド-3-リン酸 (GAP) になり GAPDH によって酸化される経路とに分岐する。後者の経路では、GAPDH に二種類あり、通常のリン酸化を伴う酵素 (GAPDH) と、伴わない非リン酸化型 GAPDH (GAPN) とがある。前者の経路ではグリセルアルデヒド酸化還元酵素 (GAOR) が働くと思われる (図 1 参照)。

GAP について、K 型のアロステリズムを示すことを発見したので、その分子機構を、推測構造に基づく変異体作成によって明らかにする。

GAOR について、菌体から複数の酵素活性画分を単離精製したので、機能の比較、構造の比較を行う。

本菌の OFOR は鉄硫黄クラスター ([4Fe-4S]) を 1 個しか持たない。その結合にかかわる Cys 残基の変異体を造り、機能を調べる。本菌のヘテロ 2 量体型 OFOR の結晶構造解析をおこない、従来ホモ 2 量体型 OFOR についてしか報告のない立体構造を、ヘテロ 2 量体酵素についても明らかにし、反応機構と構造との相関を明らかにする。

FNR は、推測される候補遺伝子を発現させて産物の機能を解析する。いずれの酵素についても、立体構造解析のための X 線結晶構造解析、ラジカルや結合金属の特性を調べるための EPR スペクトル、蛋白質の二次構造などを調べるための CD スペクトルなどの分光分析、酸化還元電位を測定するための電気化学分析を含む、蛋白質科学の方法を駆使する。

4. 研究成果

(1) GAPDH、GAPN の研究

本菌でグリセルアルデヒド-3-リン酸 GAP の酸化に関わると考えられる酵素には、非リン酸化型の GAP 脱水素酵素 (GAPN) と考えられる ORF: ST2477 と ST0064、リン酸化を

伴う従来型のGAPデヒドロゲナーゼと考えられるST1356がある。これらの遺伝子の組み換え体を精製して、精製蛋白質の機能解析を行ったところ、ST2477はGAPに対して強い正の協同性を示すアロステリック酵素GAPNであることを発見した。ST0064はコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素であること、ST1356は可逆反応を触媒するが、糖新生方向の速度が速いこと、その際NADP⁺だけを補酵素として用いることが明らかになった。これらの研究成果は、欧文誌 *FEBS Letters* 及び *Biosci. Biotechnol. Biochem.* に印刷公表した。

さらにST2477の変異体の解析を行い、1残基の変異で野生型のK型アロステリズムがV型アロステリズムに変換されることを発見した(図2)。これについては*Biochim Biophys Acta*に印刷発表した。

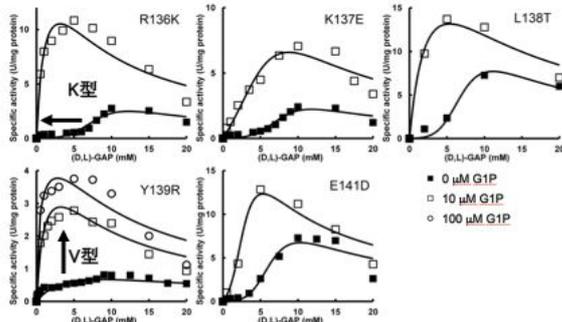


図2. R136K, K137Eは野生型とほぼ同様のK型であるが、Y139RにおいてV型への変換が見られる。

(2) グリセルアルデヒド(GA)酸化還元酵素 (GAOR) に関する研究:

スルホバス・トコダイ菌の大量培養菌体からGAORの精製を繰り返し行ったが、かつて取得に成功したGAOR1、GAOR2、GAOR3、GAOR4の4種類のうち、必ず精製できるのは、GAOR1のみであった。クロマトグラフィーに複数の活性ピークが得られたが、いずれもGAOR1と同様の酵素学的・蛋白質化学的な性質を示し、GAOR2も僅かに得られるなど、単離精製は難航した。

一方、大腸菌を宿主とする遺伝子の発現を試みた。L, M, Sの3種類のサブユニット各々の単独発現系として先ず作成したところ、Sサブユニットの組み換え体だけが、有色の蛋白質を生産することが分かった。いずれにしても、大腸菌を用いた異種発現は困難であった。

そこで、元の古細菌菌体からの精製を追究し、カラムクロマトグラフィーの組み合わせ方を検

討し、3種類のGAOR (GAOR1、GAOR2、GAOR3) を確実に得ることが可能になった。それぞれがLMS三量体を構成単位としていること、GAOR2と3とはMSサブユニットは共通でLサブユニットが異なることを明らかにした。さらにこれらのGAORの、Mo, Feなどの金属含有量、吸収スペクトル、反応特異性を調べ、Moコファクターを結合するLサブユニットによって、酵素の電子供与基質であるアルデヒドの特異性が決まることがわかった。GAOR2の結晶構造から、ヘテロ三量体GAORのサブユニット構成についてMSをscaffoldとして多様なLを結合することで酵素に多様性を付与するという構築原理が推測された。これらの結果は、論文として投稿中である。

(3) OFORの研究

OFORの結晶化には十年ほど以前に成功して、分解能3ÅのX線回折像を得ていたが、唯一既知のホモ2量体型OFORの立体構造を鋳型とした分子置換法では解を得られなかった、位相決定のため、セレノメチオニン誘導体を作成し結晶化条件を探索したが、良好な反射を示す結晶は得られなかった。そこで、目を転じて、本酵素のパラログ(OFOR2)の結晶化を試みたところ、これまで対象としていた酵素(OFOR1とする)よりも良好な結晶が、セレノメチオニン誘導体についても得られた。その結晶の反射像を用いて構造を解くことに成功した。さらにこの構造を用いてOFOR1の構造も解くことが出来た。これらの立体構造は、ヘテロ2量体が2個会合して、鳥が翼を広げたような形をしており、その翼の下に、本菌の構造既知のフェレドキシンをドッキングさせると、すっぽりとはまって、ホモ2量体型OFORと類似したコファクターの配置になった。実際にOFOR-フェレドキシン複合体の、結晶化を試みたが、良好な結晶は得られていない。これらの結果は、論文として投稿準備中である。

また、OFOR1の4個のCys残基を一つずつ、または2個、Alaに置換すると、もはや四鉄四硫黄型のクラスターは保持されず、酸化脱炭酸に伴うヒドロキシアシル中間体ラジカルや、アシルCoA形成は認められなくなったが、他方、非酸化的なアセトアルデヒド生成反応には影響がなかった。インタクトな鉄硫黄クラスターが、本酵素の特長である安定ラ

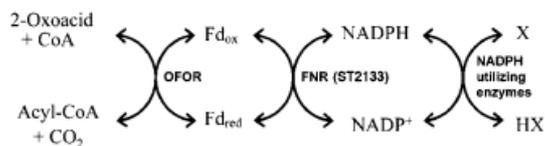
ジカル中間体の形成に必須であることが証明された。この仕事を *Biochim Biophys Acta* に印刷発表した。

(4) FNR の研究

FNR の候補遺伝子 *st2133* を発現させると黄色の蛋白質が得られた。蛋白質はホモダイマーで、FAD をサブユニット当たり一分子結合していた。電子供与体として NADH よりも NADPH を好み、電子受容体として酸素、過酸化水素、人工色素 DCPIP、フェリシアン化カリ、シトクロム *c*、DTNB などを利用することが可能で、これらの活性は FMN の添加で 10 倍以上活性化されることがわかった。さらに、NADPH によって酸化型フェレドキシンが還元され、還元型フェレドキシンが酸化される際に NADP⁺ が還元されることが明らかになった。これらの事実から、ST2133 は本菌の FNR として働き、本菌菌体内に豊富に含まれるフェレドキシンの酸化還元のサイクルにかかわることが明らかになった。以上の点について *Extremophiles* 誌に論文を印刷発表した。

本酵素の立体構造を推測したところ、好熱菌 *Thermotoga maritima* の FNR の構造と高度の類似性を示すことがわかったので、この推定構造と立体構造既知の本菌フェレドキシンとのドッキング・シミュレーションおこない、本酵素の二つのドメインの間で FAD の近傍にフェレドキシンが結合するような三通りの推定複合体構造を得た。

これまで本菌の中央代謝にフェレドキシンが大きく関与することは知られていたが、そのフェレドキシンの酸化還元サイクルが可能であることが、FNR の同定によって明らかになった。



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8件)

1. Yan Z, Nam YW, Fushinobu S, & Wakagi T (2014) *Sulfolobus tokodaii* ST2133 is characterized as a thioredoxin reductase-like ferredoxin:NADP⁺

oxidoreductase. *Extremophiles : life under extreme conditions* 18(1):99-110. (査読有) DOI: 10.1007/s00792-013 -0601-1

2. Yan Z, Fushinobu S, & Wakagi T (2014) Four Cys residues in heterodimeric 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductase are required for CoA-dependent oxidative decarboxylation but not for a non-oxidative decarboxylation. *Biochim Biophys Acta* 1844(4):736- 743. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.01.015

3. Ito F, Miyake M, Fushinobu S, Nakamura S, Shimizu K, Wakagi T. (2014) Engineering the allosteric properties of archaeal non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1844(4):759-766. (査読有) DOI:10.1016/j.bbapap.2014.01.017

4. Wakagi T (2013) Aldolase –Distinctive Characters in Archaeal Enzymes. (Review) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 25 (March)(142): 71-81. 若木高善、アルドラーゼ – 古細菌酵素の特殊性. (2014) *Trends in Glycoscience and Glyco-technology* 25(142)71-81. (査読有) doi: 10.4052/ tigg.25.71

5. Ito F, Chishiki H, Fushinobu S, & Wakagi T (2013) Archaeal Aldehyde Dehydrogenase ST0064 from *Sulfolobus tokodaii*, a Paralog of Non-Phos- phosphorylating Glyceraldehyde-3- phosphate Dehydrogenase, Is a Succinate Semialdehyde Dehydrogenase. *Biosci Biotechnol Biochem* 77(6):1344-1348. (査読有)

6. Ito F, Chishiki H, Fushinobu S, & Wakagi T (2012) Comparative analysis of two glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenases from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii*. *FEBS letters* 586(19):3097-3103. (査読有) Doi: 10.1016/j. febslet. 2012.07.059

7 . 伏信進矢、西増弘志、若木高善 (2012) 「真の二機脳性酵素の発見とその変身のメカニズム」*化学と生物* 50(2) 868-875 (査読無)

8 . 西増弘志、伏信進矢、若木高善 (2012)

「1つの酵素が2つの反応を触媒するしくみ」
日本結晶学会誌 54(2) 113-118. (査読無)

〔学会発表〕(計10件)

1. Zhen Yan, 馬込明音, 荒川孝俊, 伏信進矢, 若木高善 「超好熱性古細菌フェレドキシン NADP⁺レダクターゼの構造と機能」2015年度日本農芸化学会、2015.3.28 岡山大津島キャンパス

2. 若木高善 「超好熱菌の原始的中央代謝に見られるいくつかの興味深い酵素たち」第37回日本分子生物学会年会、2014.11.25 横浜みなとみらい

3. 宋賢珍、日高将文、淡河孝俊、伏信進矢、若木高善 「超好熱性古細菌由来無機ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼの構造と機能」日本極限環境生物学会 2014.11.03 沖縄県名護市今帰仁コミュニティセンタ

4. 若木高善 「超好熱菌の原始的中央代謝に見られるいくつかの興味深い酵素たち」千葉工大フォーラム(招待講演)2014.10.28 千葉工大

5. 伊藤史晃・知識秀裕・中村周吾・清水謙多郎・伏信進矢・若木高善 「好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase におけるアロステリック制御の解析」日本農芸化学会大会 2013年03月26日~2013年03月26日 東北大学

6. Yan Zhen・Nam Yoon-Woo・伏信進矢・若木高善 「Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase from *Sulfolobus tokodaii*」日本農芸化学会大会 2013年03月26日~2013年03月26日 東北大学

7. 伊藤史晃・知識秀裕・中村周吾・清水謙多郎・伏信進矢・若木高善 「好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の非リン酸化型グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素におけるアロステリック制御の解析」日本極限環境生物学会年会 2012年11月01日~2012年11月02日 日本大学文理学部

8. Yan Zhen・伏信進矢・若木高善 「Study on the catalytic reaction mechanism of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from *Sulfolobus tokodaii*」日本極限環境生物学会年会 2012年11月01日~2012年11月02日 日本大学文理学部

9. 伊藤史晃・知識秀裕・中村周吾・清水謙多郎・伏信進矢・若木高善 「好酸好熱性古細菌由来の非リン酸化型グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素におけるアロステリック制御の解析」日本農芸化学会関東支部大会 2012年10月27日~2012年10月28日 新潟薬科大学

10. Zhen Yan, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi 「Role of iron-sulfur cluster on the dual activities of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from *Sulfolobus tokodaii*」The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering 2012.5.28-31 Kanazawa Excel Hotel Tokyo

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

若木 高善 (Wakagi Takayoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・研究員

研究者番号:70175058

(2)研究分担者

なし()

(3)連携研究者

なし()