

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780105

研究課題名(和文) 新規な L - アミノ酸脱水素酵素の機能と立体構造解析に基づく抗トリパノソーマ薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-Trypanosoma drug based on structural and functional analysis of novel L-amino acid dehydrogenase

研究代表者

米田 一成 (YONEDA, Kazunari)

東海大学・農学部・講師

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、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：病原性寄生原虫であるトリパノソーマのゲノム情報から L-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)遺伝子を見出し、オーバーラップオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子合成を行った。合成した ThrDH 遺伝子を pCold TF ベクターに挿入し、大腸菌を用いて IPTG による遺伝子の発現を行い、発現産物の精製、及び機能解析を行った。その結果、SDS-PAGE で予測される分子量である 81 kDa にバンドの検出に成功した。さらに、酵素活性の確認を行った結果、わずかではあるが、NAD 依存性 ThrDH 活性の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：L-Threonine dehydrogenase (ThrDH) gene from the pathogenic parasite *Trypanosoma brucei* was amplified using the overlapping primers, and ligated with the expression vector pCold TF. *Escherichia coli* was then transformed with the vector and induced by adding 1.0 mM IPTG to the medium. The gene was overexpressed in *E. coli*, and its product was purified and characterized. SDS-PAGE showed the subunit molecular mass of *T. brucei* ThrDH to be about 81 kDa, which was consistent with the molecular weight calculated from the amino acid sequence. The slightly NAD-dependent ThrDH activity was determined.

研究分野：応用生物化学

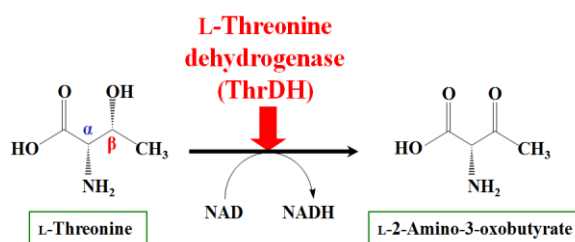
科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素化学 L-スレオニン酸脱水素酵素 NAD トリパノソーマ

## 1. 研究開始当初の背景

L-スレオニン、生体内では合成できない必須アミノ酸であるため、栄養分として摂取しなければならない重要なアミノ酸である。生体内に取り込まれた L-スレオニンは L-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)によってアミノアセトンを経由し、グリシンや L-セリンへと代謝されるため、アミノ酸代謝上重要な酵素である (図 1)。

既知の ThrDH は中鎖型脱水素酵素ファミリーに属し、これまでに常温菌や真核生物由来の酵素で機能解析が、超好熱菌由来の酵素で立体構造解析が行われている。一方、南極から単離された低温菌 *Flavobacterium frigidimaris* 及び、好熱菌である *Thermoplasma volcanium* 由来の ThrDH は、既知の ThrDH と 1 次構造上非常に低い相同性しか持たないだけでなく、既知の本酵素の活性発現に必須とされる亜鉛結合モチーフもなく、代わりに UDP-galactose 4-epimerase (GalE) に特有のモチーフを有する、特異な酵素であることを研究代表者が近年明らかにしてきた。さらに、ゲノム情報を使用し、この特異な GalE タイプ ThrDH ホモログ遺伝子の生物分布を調べた結果、バクテリアやアーキアだけでなく、ヒトやトリパノソーマなどの真核生物にも存在していることを明らかにした。興味深いのはヒトの 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、ヒトと病原性寄生原虫であるトリパノソーマ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、トリパノソーマの ThrDH は新規な抗トリパノソーマ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。



【図 1, ThrDH が触媒する酵素反応】

## 2. 研究の目的

トリパノソーマ症はアフリカ諸国で蔓延する致死性の原虫感染症であり、WHO により制圧すべき病気の 1 つに挙げられている。現在使用できる治療薬は限られており、副作用の問題からも、抗トリパノソーマ薬の開発は急務となっている。本研究ではトリパノソーマの L-スレオニン代謝に重要な役割をする酵素である「ThrDH」に着目している。トリパノソーマから見出された新規なタイプの ThrDH の機能と立体構造により、リパノソーマ由来の ThrDH を特異的に阻害する新しい治療薬開発の基礎を築くことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) ThrDH 遺伝子の発現系の構築

*Trypanosoma brucei* のゲノム情報から ThrDH 遺伝子(Tb927.6.2790)を見出し、cDNA をオーバーラップオリゴヌクレオチドを使用し作成した (図 2)。T. brucei 由来 ThrDH をコードする遺伝子を大腸菌用発現ベクターである pET11a, pET15b, pET22b, pET32a, pET42a, pGEX-4T-1, pCold I, pCold TF, pCold Pros2 ベクターに挿入した。宿主細胞は大腸菌 BL21-DE3 codon plus RIPL 株を用い、1 mM IPTG による遺伝子の発現を行った。また、酵母発現系は発現ベクターである pPIC9, pPIC9K と、宿主細胞であるメタノール資化

性酵母 *Pichia pastoris* GS-115 株を用い、1% メタノールによる遺伝子の発現を行った。

#### (2) ThrDH の精製

ThrDH の精製には Talon コバルトアフィニティカラム(Clontech)を使用した。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。また、発現及び、純度の検定には SDS-PAGE を用いた。大腸菌を用いて発現させたタンパク質が不溶性であるインクルージョンボディー (封入体) になった場合は、8M の尿素で可溶化後、リフォールディングを行い、Talon コバルトアフィニティカラムで精製を行った。精製時には宿主細胞由来のプロテアーゼによる切断を防ぐために EDTA フリーのインヒビターカクテルを使用した。

#### (3) ThrDH の活性測定

ThrDH 活性は波長 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 10.5、25 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、微量な ThrDH 活性を検出するため、ディスクゲル電気泳動と酵素活性を組み合わせた活性染色法(PMS-MTT 系)も行った。

#### (4) ThrDH の結晶化

結晶化を行うため 9 mg/ml まで精製酵素の濃縮を行い、NAD を終濃度 0.5 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, Natrix (Hampton Research), Wizard (Emerald BioSystems)を使用し 20°Cで結晶化を行った。

## 4. 研究成果

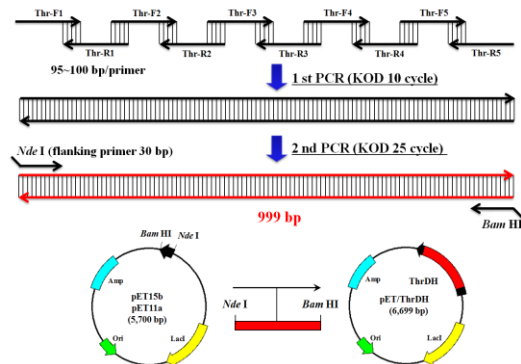
### (1) ThrDH 遺伝子の発現・精製

大腸菌用発現ベクターである pET11a, pET15b, pET22b ベクターを用いた ThrDH の発現は全て不溶性であるインクルージョンボディーとなったため (図 3)、8M の尿素で可溶化後、リフォールディングを行ったが、ThrDH 活性の検出には至らなかった。そのため、可溶性タンパク質として発現させることを目的として、融合タンパク質発現ベクターである pET32a, pET42a, pGEX-4T-1 ベクターを用いて ThrDH の発現を行ったところ pET32a ベクターはインクルージョンボディーに、pET42a と pGEX-4T-1 ベクターは発現タンパク質が SDS-PAGE で全く検出できなかった。

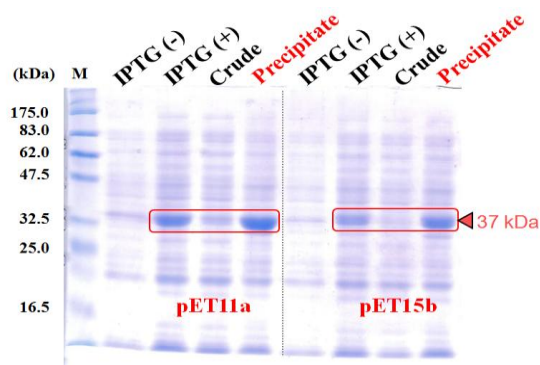
近年、インクルージョンボディーの解消にコールドショック発現系が有効である事が報告されているため、大腸菌用コールドショック発現ベクターである pCold I, pCold TF (融合タンパク質), pCold Pros2 ベクター (融合タンパク質) を用いて ThrDH の発現を行ったところ、pCold I と pCold Pros2 を用いた ThrDH の発現はこれまでと同じく、不溶性であるインクルージョンボディーであったが (図 4)、融合タンパク質である pCold TF ベクターを使用した場合にのみ、ThrDH が可溶性画分に発現することを明らかにした (図 4)。カラムから溶出した酵素の分子量を解析した結果、SDS-PAGE で予測される分子量 81 KDa (融合タンパク質 TF 44 KDa + ThrDH 37 KDa) にバンドが検出されていることから (図 5)、Talon コバルトアフィニティカラムによる精製に成功した (図 5)。最終的に LB 培地 100 ml あたり 1 ステップの簡便なカラム精製で 1.4 mg の精製酵素を得ることができた。

真核生物の発現系である酵母発現系を用いた ThrDH の発現は、pPIC9 ベクターを使

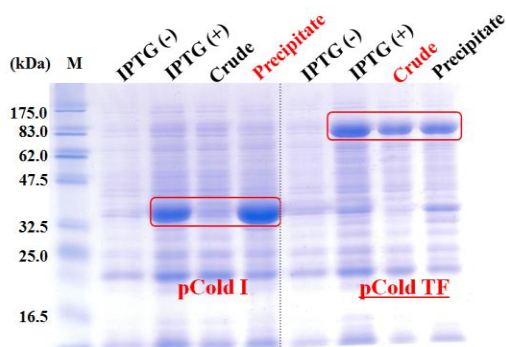
用した場合は形質転換には成功したものの、メタノール添加後に培地中に誘導される ThrDH は SDS-PAGE 及び、活性測定では検出できなかった。また、pPIC9K ベクターを用いた場合では形質転換体を得ることができなかった。



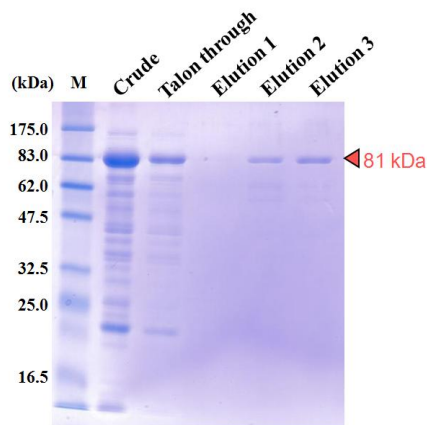
【図 2, 構築したプラスミドベクター】



【図 3, pET11a, pET15b ベクターの発現結果】



【図 4, pCold I, pCold TF ベクターの発現結果】



【図 5, pCold TF ベクターで発現させた ThrDH の精製結果】

## (2) ThrDH の活性測定・結晶化

分光光度計、及び活性染色法による ThrDH 活性の確認を行った結果、わずかではあるが NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素活性の検出に成功した。44 kDa の TF タグ（融合タンパク質）の影響で低活性になっている可能性があるため、トロンビンによる TF タグの切断を行ってから活性測定を行ったが、活性に変化は無かった。また、基質特異性を調べた結果、本酵素は L-スレオニン以外にも DL-3-hydroxynorvaline に対しても反応性を有していることが明らかになった。また、異性体である D-スレオニンや基質アナログである DL-*allo*-threonine、DL-*threo*-3-phenylserine、DL-serine に対する反応性は検出できなかった。

現在、ThrDH/NAD の 2 者複合体立体構造を解析するために結晶化スクリーニングを行っているが、X線回折実験に適した良好な結晶は得られていないため、今後さらなる酵素の精製、結晶化スクリーニングを行う予定である。

## 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)

- ① Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Shibata T, Nikki T, Ohshima T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-serine 3-dehydrogenase complexed with NADP<sup>+</sup> from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Acta Crystallographica Section F*. 査読有, Vol. 69, 2013, 134-136
- ② Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T. Crystal Structure of the binary and ternary complexes of an archaeal UDP-galactose 4-epimerase-like L-threonine dehydrogenase from *Thermoplasma volcanium*. *J. Biol. Chem.* 査読有, Vol. 287, 2012, 12966-12974
- ③ Yoneda K, Fukuda Y, Shibata T, Araki T, Nikki T, Sakuraba H, Ohshima T. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of NAD(P)H-dependent carbonyl reductase specifically expressed in the thyroidectomized chicken fatty liver. *Acta Crystallographica Section F*. 査読有, Vol. 68, 2012, 1568-1570
- ④ Sakuraba H, Satomura T, Kawakami R, Kim K, Hara Y, Yoneda K, Ohshima T. Crystal Structure of Novel Dye-linked L-Proline Dehydrogenase from Hyperthermophilic Archaeon *Aeropyrum pernix*. *J. Biol. Chem.* 査読有, Vol. 287, 2012, 20070-20080
- ⑤ Sakuraba H, Kawai T, Yoneda K, Ohshima T. Structure of a UDP-glucose dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*. *Acta Crystallographica Section F*. 査読有, Vol. 68 2012, 1003-1007

[学会発表] (計 3 件)

- ① 米田 一成、櫻庭 春彦、荒木 朋洋、大島 敏久、トリパノソーマ由来 NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素の性質と構造、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日、とりぎん文化会館
- ② 米田 一成、櫻庭 春彦、荒木 朋洋、大島 敏久、トリパノソーマ由来 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 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学
- ③ 米田 一成、新規な補酵素 NAD(P)依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能と構造解析、第 1 回佐賀大学総合分析実験センターシンポジウム (招待講演)、2013 年 3 月 18 日、佐賀大学

[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

<http://www2.ktokai-u.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・講師

研究者番号 : 00469397