

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440049

研究課題名(和文)細菌由来の新規L-ヒドロキシプロリン代謝酵素の解析

研究課題名(英文) Biochemical characterization of functional enzymes involved in L-hydroxyproline metabolism from bacteria

研究代表者

渡邊 誠也 (WATANABE, SEIYA)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：90379032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のL-ヒドロキシプロリン代謝酵素の生化学的解析を行った。D-ヒドロキシプロリン脱水素酵素の、のサブユニットのうち、が触媒サブユニットとして機能し、他のサブユニットは構造維持と活性向上に働いていると考えられた。また、FMNには少なくともと の両サブユニットが必要だった。Pyr4H2C脱アミノ化酵素のLys164は、水素化ホウ素ナトリウム存在下で Schiff 塩基中間体を形成することが分かった。T4LHyp 資化能を持つ細菌の中には別のL-ヒドロキシプロリンも分解できるものがあり、その代謝に関わるT3LHyp脱水酵素と 1-ピロリン-2-カルボン酸還元酵素の同定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Biochemical characterization of functional enzymes involved in L-hydroxyproline metabolism from bacteria were carried out. D-Hydroxyproline dehydrogenase consisted of -, - and -subunits, in which the -subunit played a role as a catalytic subunit, and the remaining them functioned to maintain the structural folding and/or to improve the catalysis. A lysine residue at the position of 164 formed a Schiff base intermediate under NaBH₄. Several bacteria could metabolize not only 4-hydroxyproline but also 3-hydroxyproline, and trans-3-hydroxy-L-proline dehydratase and 1-pyrroline 2-carboxylate reductase involved in the 3-hydroxyproline metabolism were identified enzymatically and genetically.

研究分野：生化学

キーワード：L-ヒドロキシプロリン 遺伝子クラスター 物質代謝

1. 研究開始当初の背景

現在のような分子生物学やゲノム科学が隆盛する前の1960-1980年代において、新規酵素や代謝経路を見つけ出す主な手法は、環境中からの微生物探索や無細胞抽出液中の酵素活性の検出であり、これらは偶発性に大きく左右されるだけでなく膨大な時間と労力、コストが必要だった。そして、現在でも詳細な追加研究や遺伝子の単離が行われていない酵素が数多く存在する。一方で、塩基配列解析技術の飛躍的進展に伴い、特に微生物では数週間でゲノムのドラフト配列が読める時代になっており、その中には前述の古典的研究において材料として使われた微生物(あるいはその類縁種)が含まれる場合が多い。これを活用すればやみくもな新規酵素や代謝経路の探索より確実性は増すはずである。

とはいえ、膨大な機能未知遺伝子の中からそれらを探索するのは非常に困難である。そこで、代謝酵素遺伝子はしばしばゲノム上でオペロン(あるいはクラスター)になっている、相同な反応を触媒する酵素は少数の限定されたタンパク質ファミリーに属している、という点に着目し、これまで数多くの新規代謝経路を発見してきた(これをGene-clustering annotationと名付ける)。この手法の有用性をさらに実証する目的で、本研究では細菌のL-ヒドロキシプロリン(L-Hyp)代謝に注目した。

2. 研究の目的

L-Hypはコラーゲンに含まれる非標準アミノ酸であり、プロリン残基の翻訳後修飾により形成される。水酸化される部位の違いによりtrans-4-hydroxy-L-proline(T4LHyp)とtrans-3-hydroxy-L-proline(T3LHyp)があるが、前者のほうが存在量ははるかに多い。細菌によるT4LHyp代謝経路も1970年代にその存在が提唱されており、L-Hyp異性化酵素、D-ヒドロキシプロリン脱水素酵素(D-HypDH)Pyr4H2C脱アミノ化酵素、KGSA脱水素酵素、の4つの酵素が関わっていると考えられてきたが、その後詳細な研究は行われていない。

T4LHyp代謝が確認されている細菌は少数だが、そのうち*Pseudomonas putida*と*Pseudomonas aeruginosa*はすでにゲノム解読が終了している。そこで、これらの配列に対してGene-clustering annotation解析を行った結果、上記4つの酵素をコードする遺伝子が集まったクラスターを見出した。そこで、本研究ではこれをもとにタンパク質の詳細な生化学的機能解析を行うことにした。

(1) D-HypDH

初期的な解析の結果、D-HypDHは既知のアミノ酸脱水素酵素とはほとんど相同性がないだけでなく、*P. putida*と*P. aeruginosa*の間でも一次構造の相同性・サブユニット構成・電子伝達体補因子が大きく異なり収斂進

化したことが強く示唆されていた。そこで本研究では、特にヘテロタイプの酵素について基質特異性に関わるアミノ酸残基、電子伝達補因子の触媒反応における機能、等を明らかにすることにした。

(2) Pyr4H2C脱アミノ化酵素

Pyr4H2C脱アミノ化酵素は、アルドラーゼファミリーに属しながら全く異なる反応を触媒する。本研究では、本酵素に特有の活性部位を同定することを試みた。

(3) T3LHyp代謝経路の解明

研究の過程で、窒素固定細菌*Azospirillum brasilense*がT4LHypだけでなくT3LHypの資化能も持つことが分かった。無細胞抽出液中の活性を見たところ、T3LHypはT4LHyp代謝酵素群を全く誘導せず、代わりにT3LHyp脱水素酵素とNAD(P)H依存性 Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸(Pyr2C)還元酵素活性が顕著に誘導されたことから、T3LHypPyr2CL-プロリンと変換される仮想経路が示唆された。そこで、本研究ではこれらの遺伝子を同定するとともに、詳細な酵素学的性質を解明することにした。

(4) 機能未知遺伝子PA1259

*P. aeruginosa*のL-Hyp遺伝子クラスターには、前述のT4LHyp代謝酵素やアミノ酸トランスポーターに加え、アコニターゼ様タンパク質(PA1259)が含まれている。一次構造の相同性ではL-Hyp代謝との関与は見出せないが、研究を行う過程で機能解明のヒントを見出す。

3. 研究の方法

(1) D-HypDH

当初、ヘテロタイプ酵素として*P. aeruginosa*由来のものを使う予定だったが、窒素固定細菌*Azospirillum brasilense*由来の遺伝子(AbHypDH)を新たにクローニングし用いることにした。これは、AbHypDHが大腸菌でも発現可能であり、さらにサブユニットごとに分離して発現ベクターにクローニングすることで部位特異的の変異体作成が容易になるからである。

ヘテロタイプ酵素は、のサブユニットからなる12量体(4₄4₄)である。各サブユニットの役割を明らかにする目的で、(に相当する遺伝子)をpETDuet-1に、をpACYCDuet-1に、をpCOLADuet-1のベクターにN末端にヒスチジンタグが付加されるように入れ、大腸菌BL21(DE3)株で単独、あるいは組み合わせて発現させ、ニッケルカラムで精製した。

(2) Pyr4H2C脱アミノ化酵素

*P. putida*由来の遺伝子の大腸菌での発現系と、ヒスチジンタグを利用した精製系をすでに確立しており、本研究でもそれを用いた。Single round PCR法により部位特異的の変異体を作製し、大腸菌で発現したものについては野生型と同様に精製した。

(3) T3LHyp代謝経路の解明

ゲノム情報を活用した *in silico* 解析により、T3LHyp 脱水酵素遺伝子の候補として、先ごろ哺乳類で見出された同活性を発揮する酵素と相同な *LhpH* を選抜した。一方、知られている Pyr2C 還元酵素としては *P. putida* 由来の DpkA があり、そのホモログは *A. brasilense* でも *LhpD* として存在していた。しかしこの遺伝子は L-Hyp 遺伝子クラスター内にあり、これは T3LHyp がこのクラスターを誘導しないという知見と矛盾する。そこで、*LhpH* の近傍を見てみると、オルニチンシクロデアミナーゼ (OCD) 様の *LhpI* が存在していた。OCD は L-オルニチンを脱アミノの閉環反応により L-プロリンを生成する酵素だが Pyr2C が反応中間体として想定されており、Pyr2C 還元酵素はまさにこの OCD の後半の部分に当たる。このような知見から、*LhpD* と *LhpI* の両方を解析することにした。

(4) 機能未知遺伝子 PA1259

大腸菌では全く発現しなかったため、*P. putida* 変異株を宿主とした発現系を構築した。組み換えタンパク質を用いて基質推定、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) D-HypDH

まず活性についてだが、脱水酵素活性を示したのは、*P. putida* (野生型) の 3 個であり、天然基質である *cis*-4-hydroxy-D-proline (C4DHyp) に対する k_{cat}/K_m は $1.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ と行くに連れて約 10 倍ずつ低下し、これは主に K_m の寄与によるものだった。次に、フラビン補因子の結合については、FAD のみが遊離してきたものが *P. putida* と、FAD と FMN が遊離してきたものが *A. brasilense* と、何も遊離してこなかったものが *P. putida* だった。この結果は、FAD が *P. putida* に 1 分子ずつ、FMN が *A. brasilense* の界面に 1 分子結合するのではないかと、という仮説とも一致する。最後に熱安定性を比較したところ、*P. putida* では大幅な低下が見られた。以上の結果を総合すると、D-HypDH の 3 つのサブユニットのうち *P. putida* が触媒サブユニットとして機能し、他のサブユニットは構造維持と活性向上に働いていると考えられる。また、FMN には少なくとも *P. putida* と *A. brasilense* の両サブユニットが必要で、*P. putida* は必須ではないが安定性維持には重要なことが示唆された。

古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 L-プロリン脱水酵素 (PhPDH) はヘテロタイプ D-HypDH と相同性があるが、基質が結合したホロ酵素の立体構造情報が利用できない。対して、古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 PDH は相同性は低いものの、L-プロリンとの複合体構造が最近明らかになった。立体構造ベースの重ね合わせにより、AbHypDH のサブユニットの 87 番目のスレオニン残基が L-プロリンの 4' 位の位置に近く、L-プロリンのみを基質とする PDH はこの残基がアラニン、あるいはグリシンになっていた。そこで、

pACYCDuet-1 に T87A および T87G 変異体遺伝子をクローニングし、*P. putida* のサブユニット発現プラスミドと組み合わせて大腸菌で発現、精製した。残念なことに両変異体とも L-プロリンおよび T4LHyp のいずれにも不活性であったが、この部位がプロリン骨格の認識に共通して重要なことが示唆された。

(2) Pyr4H2C 脱アミノ化酵素

本酵素が属する DHDS/NAL プロテインファミリーメンバーの酵素の触媒機構では、活性部位のリシン残基と基質のケト基の間で“シッフ塩基中間体”が形成され、それをチロシン残基のフェノール性側鎖の水酸基が安定化する。これらの残基は、*P. putida* 由来 Pyr4H2C 脱アミノ化酵素の Lys164 と Tyr136 に相当する。

シッフ塩基中間体は、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) 存在下で安定な状態で捕捉することができる。その後、トリプシンで切断して質量分析 (MS) にかけてやると、上記修飾されたリシン残基の部分では切断がおこなわれないため、ペプチド断片のピークがずれることになる。基質である Pyr4H2C では反応が進行してしまうため、競合阻害剤であるピルビン酸を用いて実験を行った。その結果、シッフ塩基中間体を形成した場合のペプチド断片の分子量 (= 2124) に相当するピークが得られた。その MS/MS で得られるピークを未処理・処理サンプルで比較すると、Lys164 以降のピークが修飾された分子量の分だけ高分子量側へずれたことから、このリシン残基がシッフ塩基を形成することが証明できた。

上記リシンとチロシンは保存されていることから、特異的脱アミノ化反応は別の残基が関与していると考えられる。活性部位の候補として、*Sulfolobus solfataricus* 由来 D-2-keto-3-deoxygluconate aldolase の立体構造情報から、Asp193 と Asp255 を選抜した。これをアラニンに置換した D193A と D255A のうち、前者は大腸菌で発現せず、後者は発現はしたが脱アミノ活性もアルドラーゼ活性も示さなかった。そこで、Asp255 をランダムに変異させたライブラリを構築した。すべての変異体を得られたわけではないが、得られたものはすべて大腸菌で発現しないか酵素的に不活性だったため、これ以上の知見は得られなかった。ただ、側鎖のサイズが等価なセリンや電荷が等価なグルタミン酸への置換も許容されないことから、活性にきわめて重要であることは間違いない。

(3) T3LHyp 代謝経路の解明

A. brasilense 由来の *LhpH* 遺伝子の大腸菌による組み換えタンパク質の分析で、T3LHyp 脱水酵素としての機能が証明された。

LhpD は DpkA と同様に NADPH 特異的であり、これは *A. brasilense* を T4LHyp で培養した際に誘導される NADPH 依存性 Pyr2C 還元酵素の正体と考えられた。次に *LhpI* だが、こちらは NADPH も NADH も同程度に使うことがで

き、Pyr2C に加え D-リジン代謝の中間物である Δ^1 -ピペリジン-2-カルボン酸 (Pip2C) にも活性を示した。これは、LhpI 破壊株が T3LHyp に加え D-リジンでも生育できない結果と一致する。好冷菌 *Colwellia psychrerythraea* 34H と超高度好熱古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM 54732 の LhpH ホモログの周辺にも OCD 様遺伝子が存在するが、分子系統的にみると *A. brasilense* の LhpI とは遠い関係にある。組み換えタンパク質の解析の結果、好冷菌の酵素の基質は (Pip2C ではなく) Pyr2C であり明らかな NADPH 依存性を示した。一方、古細菌の酵素は完全な NADH 依存性で、Pyr2C だけでなくピルビン酸や他の 2-Oxoacid にも幅広く活性を示した。これは、この酵素が L-アラニン脱水素酵素と近いことを反映していると考えられた。このように、微生物の Pyr2C 還元酵素は、DpkA と OCD の異なるタンパク質ファミリー間だけでなく、OCD スーパーファミリー内でも収斂的に進化したことを強く示唆した。

(4) 機能未知遺伝子 PA1259

基質と反応様式の同定に成功し、平成 28 年度からの科学研究費助成事業で研究を継続することになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Watanabe, S., Sueda, R., Fukumori, F. and Watanabe, Y. (2015) Characterization of flavin-containing opine dehydrogenase from bacteria. *PLoS One* 10, e0138434. (査読有)
 2. Watanabe, S., Tanimoto, Y., Nishiwaki, H. and Watanabe, Y. (2015) Identification and characterization of bifunctional proline racemase/hydroxyproline epimerase from archaea: discrimination of substrates and molecular evolution. *PLoS One* 10, e0120349. (査読有)
 3. Sakamoto, H., Watanabe, K., Koto, A., Koizumi, G., Satomura, T., Watanabe, S. and Suye, S. (2015) A bienzyme electrochemical biosensor for the detection of collagen L-hydroxyproline. *Sensing and Bio-sensing Research* 4, 37-39. (査読有)
 4. Watanabe, S., Hiraoka, Y., Endo, S., Tanimoto, Y., Tozawa, Y. and Watanabe, Y. (2015) An enzymatic method to estimate the content of L-hydroxyproline. *J. Biotechnol.* 199, 9-16. (査読有)
 5. Watanabe, S., Tozawa, Y. and Watanabe, Y. (2014) Ornithine cyclodeaminase/ μ -crystallin homolog from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* functions as a novel 1 -pyrroline-2-carboxylate reductase involved in putative *trans*-3-hydroxy-L-proline metabolism. *FEBS Open Bio* 4, 617-626. (査読有)
 6. Watanabe, S., Tanimoto, Y., Yamauchi, S., Tozawa, Y., Sawayama, S. and Watanabe, Y. (2014) Identification and characterization of *trans*-3-hydroxy-L-proline dehydratase and 1 -pyrroline-2-carboxylate reductase involved in *trans*-3-hydroxy-L-proline metabolism of bacteria. *FEBS Open Bio* 4, 240-250. (査読有)
- [学会発表](計 16 件)
1. 渡辺 誠也 微生物の代謝経路と酵素 東洋大学食環境科学部食環境科学科“応用酵素学”外部講師 2015 年 11 月 12 日 東洋大学(群馬県板倉町)
 2. 渡辺 誠也 アーキアのプロリン・ヒドロキシプロリン関連酵素の最近の知見 第 28 回日本 Archaea 研究会講演会 2015 年 7 月 23 日 愛媛大学(愛媛県松山市)
 3. 渡辺 誠也 バクテリアのオピンコンセプトに関わるフラビン依存性オピン脱水素酵素 農芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会 2015 年 9 月 18 日 愛媛大学(愛媛県松山市)
 4. 渡辺 誠也 プロリンとヒドロキシプロリンの両者に作用し立体異性変換を触媒する古細菌由来の酵素 第 56 回日本生化学会中国・四国支部例会 2015 年 5 月 30 日 島根大学(島根県松江市)
 5. 渡辺 誠也 微生物代謝酵素を利用したヒドロキシプロリンの定量法 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 28 日 岡山大学(岡山県岡山市)
 6. 渡辺 誠也 第 3 回置賜マイクロナノバイオフォーラム「微生物機能の制御と産業利用」2015 年 2 月 5 日 伝国の杜・置賜文化ホール(山形県米沢市)
 7. 渡辺 誠也, 谷本 佳彰, 山内 清司, 戸澤 謙, 渡部 保夫 細菌によるトランス-3-ヒドロキシ-L-プロリン代謝経路の解明 第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 17 日 京都国際会館(京都府京都市)
 8. 渡辺 誠也 微生物のヒドロキシプロリン代謝 日本農芸化学会中四国支部第 18 回若手シンポジウム「微生物由来のアミノ酸関連酵素」2014 年 9 月 20 日 愛媛大学(愛媛県松山市)
 9. 渡辺 誠也, 谷本 佳彰, 山内 清司, 戸澤 謙, 渡部 保夫 細菌のトランス-3-ヒドロキシプロリン代謝経路の解明 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 2014 年 6 月 6 日 愛媛大学(愛媛県松山市)
 10. 渡辺 誠也 ヒドロキシプロリンを酵素で定量する 日本農芸化学会中四国支部第 38 回講演会(例会) 2014 年 1 月

- 25日 香川大学(香川県三木町)
11. 渡辺 誠也 細菌のヒドロキシプロリン代謝 国立遺伝学研究所研究会「細菌細胞の増殖と代謝研究会(スイッチング制御)」2013年11月28-29日 国立遺伝学研究所(静岡県三島市)
 12. 渡辺 誠也 新しい酵素の発見と産業への応用 農芸化学会中四国支部第16回若手シンポジウム 2013年11月2日 高知大学(高知県南国市)
 13. 渡辺 誠也, 谷本 佳彰, 西脇 寿, 戸澤 譲, 渡部 保夫 細菌によるコラーゲン由来ヒドロキシプロリン代謝に関する新知見 第86回日本生化学会大会 2013年9月11-13日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 14. 渡辺 誠也 D型異性体を介した細菌の新規L-ヒドロキシプロリン代謝経路の解明と産業応用 第9回D-アミノ酸研究会学術講演会 2013年9月5日 関西大学(大阪府吹田市)
 15. 渡辺 誠也 生体サンプル中のコラーゲンを酵素で定量 JST 四国地区五大学新技術説明会 2013年6月21日 JST 東京別館(東京都千代田区)
 16. 渡辺 誠也 L-ヒドロキシプロリンの簡便・迅速な定量方法 第12回国際バイオテクノロジー展/技術会議(BIOtech 2013) 2013年5月8-10日 東京国際展示場(東京都江東区)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

1. PCT/JP2014/065019
発明の名称:3-ヒドロキシプロリンの分析方法、コラーゲンの測定方法、およびそれに用いる新規¹-ピロリン-2-カルボン酸還元酵素
発明人:渡辺 誠也, 谷本 佳彰
出願人:国立大学法人愛媛大学
出願日:2014年6月5日
2. 特願 2013-186647
発明の名称:3-ヒドロキシプロリンの分析方法、コラーゲンの測定方法、およびそれに用いる新規¹-ピロリン-2-カルボン酸還元酵素
発明人:渡辺 誠也, 谷本 佳彰
出願人:国立大学法人愛媛大学
出願日:2013年9月9日
3. 特願 2013-95772
発明の名称:L-ヒドロキシプロリンの分析方法、コラーゲンの測定方法、およびそれに用いるD-ヒドロキシプロリン脱水素酵素
発明人:渡辺 誠也, 森本 大地, 笹井 雄貴
出願人:国立大学法人愛媛大学
出願日:2013年4月30日

6. 研究組織

(1)研究代表者
渡辺 誠也 (WATANABE SEIYA)
愛媛大学農学部・准教授
研究者番号:90379032

(2)研究分担者
なし