

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450132

研究課題名(和文)立体構造のトポロジーから紐解くDyP型ペルオキシダーゼの合理的改変

研究課題名(英文)Rational design of DyP type peroxidase based on the topology

研究代表者

菅野 靖史 (SUGANO, Yasushi)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：90282855

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)：DyP型ペルオキシダーゼは、最近発見された新しいタンパク質ファミリーである。しかし、その機能と構造の関係には未解明な部分が多々あった。本研究では、立体構造と機能の関係を関連付け、合理的なタンパク質の改変法を探った。その結果、このタンパク質ファミリーは、立体構造のトポロジーが類似するものの、起源遺伝子の異なる3つの遺伝子から進化し、いずれもペルオキシダーゼとしての機能を有することが分かった。これは、タンパク質も収束進化するという事実を、立体構造を解くことで初めて合理的に説明したものである。

研究成果の概要(英文)：DyP-type peroxidase is a novel peroxidase family, which was defined in 2007. Therefore, we had little known its physiological function and structure. In this study, we tried to solve the relationship between its structure and function. Interestingly, DyP-type peroxidase family has been found to be divided to 3 classes, that is classes P, I and V based on structural based homology alignment. Moreover, each class must be evolved independently from different origin. It suggests that some of proteins as well as DyP-type peroxidase family also do convergent evolution as some organisms.

研究分野：分子進化

キーワード：DyP DyP型ペルオキシダーゼ 分子進化 収束進化 タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

従来、同一機能のタンパク質は立体構造も似ている例が数多く報告されているが、その場合は一次構造にも相同性が見られる事も多い。それ故に、一次構造の相同性で類似のタンパク質を探す事は、理にかなっている。これを発展的にとらえたものが、一次構造を基にランダムに変異をかけて網羅的に機能を探索する進化分子工学である。この方法は、特定の一次構造を出発点とするため、アミノ酸配列レベルで変異したタンパク質についての機能研究をするための強力なツールである。一方で、一次構造に相同性がないタンパク質同士については、その立体構造のみならず機能についても相同性はないと考えられがちであり、研究が手薄であったことは否めない。ところが、最近、応募者らが発見した DyP 型ペルオキシダーゼファミリーと名付けた一群のタンパク質は、

- 従来ペルオキシダーゼとは一次構造も立体構造も全く異なっている。
- 一次構造の相同性が極めて低いにもかかわらず、立体構造のトポロジーには極めて高い類似性がある

事が明らかとなってきた。つまり、

- 機能が同じタンパク質でも、一次構造も立体構造も異なる場合がある
- DyP 型ペルオキシダーゼファミリーは、一次構造ではなく立体構造のトポロジーの類似性で分類できる

という事を意味している。さらに興味深い事に、DyP 型ペルオキシダーゼと称しつつも、ペルオキシダーゼ以外の機能を合わせ持つものも報告されている。これらの事実から、DyP 型ペルオキシダーゼの多様性は、一つの起源タンパク質の遺伝子の変異に伴い、アミノ酸配列の変異、遺伝子重複等によってタンパク質が変化(分化或いは進化)するという従来の考え方(グロビン類の進化など)では説明できない。そこで応募者は、アミノ酸配列にほとんど相同性がないにもかかわらず、立体構造のトポロジーが類似するタンパク質は、そのそれぞれに独立した起源遺伝子が存在したと考える。この仮定に従えば、DyP 型ペルオキシダーゼの構造トポロジーが驚くほど似ているのに、アミノ酸配列の相同性が極めて低いことを矛盾なく説明できる。同時に、従来の一次構造の相同性探索や進化分子工学的な手法とは別に、立体構造に注目することで機能の類似したタンパク質の存在を予測する事が可能となる。恐らく、様々なタンパク質に、この仮定は当てはまると考えられるが、これまでモデル研究に適したタンパク質は報告されていない。その中で、DyP 型ペルオキシダーゼファミリーは、複数の機能、類似のトポロジー、多様なアミノ酸配列の存

在などの事実が明らかになりつつある。従って、DyP 型ペルオキシダーゼが、従来の一次構造の相同性ではなく、高次構造の類似性に基づく合理的な改変を行うのに格好なタンパク質であり、新たな機能を持つタンパク質を創成するためのモデル研究材料として期待されている。

2. 研究の目的

一次構造の類似性に基づくタンパク質の分類や分子進化の考え方から、立体構造の類似性に注目したクラス分けが合理的であることを提案する。そのために、*Streptomyces avermitilis* 由来の DyP 型ペルオキシダーゼの生化学的な機能解明を行い、既知の DyP 型ペルオキシダーゼと比較し、立体構造を重視したクラス分けの妥当性を検証する。

3. 研究の方法

一次構造と立体構造が既知の DyP 型ペルオキシダーゼについて、MATLAS を用い立体構造情報を基盤としたデンドログラムを作成した。さらに、機能未知の 4 つの *Streptomyces avermitilis* 由来の DyP 型ペルオキシダーゼ遺伝子を、大腸菌または *Streptomyces lividans* で発現させる系を構築した。発現したタンパク質の精製と生化学的な機能解析を行った。

4. 研究成果

既知の DyP 型ペルオキシダーゼの立体構造情報と生化学的な機能解析をまとめ、新たなクラス分け、すなわち従来の一次構造に基づく類似性のクラス分けに従った A, B, C, D の 4 クラスから、P, I, V の 3 クラスに分ける分類が最も合理的であることが明らかとなった(図 1)。さらに、P, I, V のそれぞれのクラスのタンパク質には、相互の類似性が低いものの、クラス内では、そのクラスを決定づける特有のアミノ酸配列があることも明らかとなった(図 2)。このことは、クラス内のタンパク質は、同一の遺伝子起源から分子進化したが、クラス間では共通の遺伝子が存在しない可能性を示唆している。この発見は、従来の類似のタンパク質は同一の起源遺伝子を持つとする仮説が必ずしも当てはまらないタンパク質群が存在することを示唆している。

この結果を基に、*S. avermitilis* が保持していると推定される 4 つの DyP 型ペルオキシダーゼ遺伝子、すなわち SaDyP1 から SaDyP4 までの全ての遺伝子の翻訳産物がどのクラスに分類されるかを推定した。まず、それらの一次構造から、クラス内で特異的なアミノ酸配列の有無を調べ、SaDyP2 と SaDyP1 はクラス V の、SaDyP3 と SaDyP4 はクラス I に属することが予測された。一方で、これら 4 遺伝子は、その翻訳産物に対する研究報告はなく、実際にペルオキシダーゼ

として機能しているか否かは不明であった。これらの遺伝子を大腸菌又は *Streptomyces lividans* で発現させ、SaDyP2 と SaDyP1 の

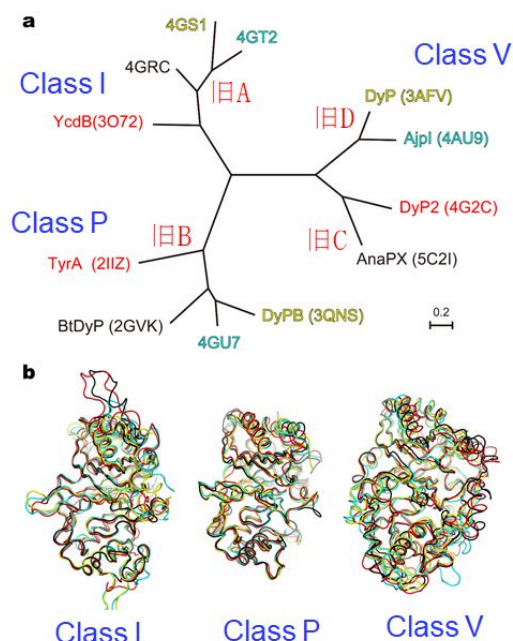


図1 立体構造情報に基づいたDyP型ペルオキシダーゼの新しいクラス分け。旧クラスCとDはクラスVに統合されることが明らかとなった。

諸性質を調べたところ、クラスVの特徴を有していることが分かった。一方、SaDyP4については、クラスIの特徴を有していることが分かった。SaDyP3については、発現量が少なく詳細なデータは取れていないが、これについてもクラスIの特徴を有していると考えられる。

これにより、立体構造情報によるクラス分けの合理性が支持されたと考える。

課題として、今回 SaDyP1 から4までのいずれにおいても、それらの構造解析に至らなかったことがある。構造解析はX線結晶構造解析で行う予定であったので、結晶化を試みたが、良質の結晶を得ることができなかった

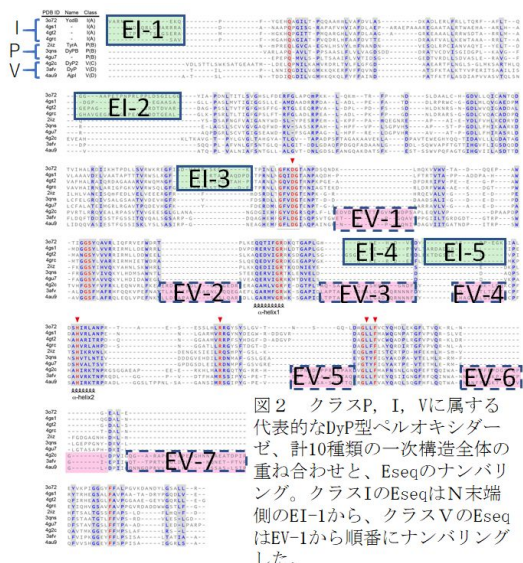


図2 クラスP, I, Vに属する代表的なDyP型ペルオキシダーゼ、計10種類の一次構造全体の重ね合わせと、Eseqのナンバリング。クラスIのEseqはN末端側のEI-1から、クラスVのEseqはEV-1から順番にナンバリングした。

ためである。*Streptomyces* 由来のDyP型ペルオキシダーゼ自体に結晶化しにくい要因があるのか、たまたま適切な結晶化条件が見つからなかったのかは定かではない。

今後は、さらに研究例を増やし、DyP型ペルオキシダーゼ以外のタンパク質においても、立体構造の相同性に基づくタンパク質のクラス分けの重要性について検証する必要がある。

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 3件)

- 1) K. Sugawara, Y. Nishihashi, T. Narioka, T. Yoshida, M. Morita, Y. Sugano Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Streptomyces avermitilis*. J. Biosci. Bioeng. 123, 425-430, 2017. 査読有
- 2) T. Yoshida, HJ Ogola, Y. Amano, T. Hisabori, H. Ashida, Y. Sawa, H. Tsuge, Y. Sugano *Anabaena* sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers. Proteins 84, 31-42, 2016. 査読有
- 3) T. Yoshida, Y. Sugano A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. Arch. Biochem Biophys. 574, 49-55, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 8件)

- 1) M. Shinoda, A. Imamura, T. Yoshida, K. Sugawara, Y. Sugano Perspective of an electron transfer route of DyP from *Bjerkandera adusta* Dec 1. ComBio 2017
- 2) 外山彩香, 大出恵津乃, 天野芳美, 長谷川美穂, 菅原佳奈子, 菅野靖史 担子菌 *Bjerkandera adusta* 由来酵素 DyP の生理的機能 2016年 生体触媒化学シンポジウム
- 3) 西橋友理子, 菅原佳奈子, 成岡知美, 森田美文, 吉田 徹, 菅野靖史 放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来 DyP 型ペルオキシダーゼの機能解析 2016年 生体触媒化学シンポジウム
- 4) 齋藤麻理, 岡部海里, 森澤理紗, 菅原佳奈子, 菅野靖史 アセトニトリル分解能を有する微生物の探索と機能解析に向けて 2016年 日本農芸化学会大会

- 5) 大出恵津乃, 天野芳美, 長谷川美穂, 佐藤麻衣, 菅野靖史 担子菌 *Bjerkandera adusta* Dec 1 株が分泌する酵素 DyP の生理的機能 2016年 日本農芸化学会大会
- 6) 菅原 佳奈子, 成岡 知美, 加藤 史帆, 菅野 靖史 *Streptomyces avermitilis* 由来 DyP 型ペルオキシダーゼの異種発現と特性解析 2016年 日本農芸化学会大会
- 7) Y. Sugano, T. Yoshida An improved classification of DyP-type peroxidase family accelerates the research of the family. FEMS Congress 2015.
- 8) 菅野靖史 DyP 型ペルオキシダーゼの機能解析 2015年 日本生化学会大会

〔その他〕

ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~ysugano/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野靖史 (SUGANO Yasushi)
日本女子大学・理学部・教授
研究者番号: 90282855

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

津下英明 (TSUGE Hideaki)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号: 40299342

(4) 研究協力者

吉田 徹 (YOSHIDA Toru)
京都産業大学・総合生命科学部・研究助教
研究者番号: 30724546