

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570135

研究課題名(和文)多段階翻訳後修飾反応を伴うキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成プロセス

研究課題名(英文)Biogenesis process of quinohemoprotein aminodehydrogenase accompanying multi-step posttranslational modification reactions

研究代表者

中井 忠志 (NAKAI, Tadashi)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：00333344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水溶性ビタミンに由来する従来の補酵素と異なり、タンパク質の翻訳後修飾反応により形成されるキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素(QHNDH)の生合成プロセスの解明を目的として以下の研究を実施した。遺伝子破壊法によりQHNDHの生合成に必須な遺伝子を新たに3個(qhpF, qhpG, qhpR)を同定し、それらの機能を解明した。QhpEタンパク質を機能解析し、QhpEが非常に奇妙な使い捨て型のタンパク質分解酵素であることを明らかにした。QhpDタンパク質を無酸素状態で取り扱うことにより大量調製を可能とし、試験管内でチオエーテル架橋の形成反応を再現することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Peptidyl built-in cofactors are produced by posttranslational modification of the cognate enzyme proteins, unlike ordinary cofactors which are mostly bio-synthesized from water soluble vitamins. In this study, we focused on a built-in quinone cofactor-containing enzyme, quinohemoprotein amine dehydrogenase (QHNDH) that contains cysteine tryptophyl quinone (CTQ). The structural genes encoding QHNDH in Gram-negative bacteria constitute a polycistronic operon together with several nearby genes, which are collectively termed qhp. (1) We have identified three peripheral genes, qhpFGR, that are also absolutely required for the QHNDH biogenesis. (2) We have analyzed the function of QhpE and revealed that QhpE is an extremely unusual protease that cleaves its substrate nearly in a disposable manner. (3) We have succeeded in in vitro formation of thioether cross-links using overproduced recombinant QhpD only if it is purified and handled under anaerobic conditions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：翻訳後修飾 補酵素の生合成 結晶構造解析 キノヘムプロテイン ビルトイン型キノン補酵素 ラジカルSAMタンパク質 分子内チオエーテル架橋 酵素触媒機構

### 1. 研究開始当初の背景

酵素の触媒機能を助ける補酵素の多くは、水溶性 B 群ビタミンなどから生合成された後、別途に合成された前駆体酵素タンパク質 (アポ酵素) に取り込まれる。しかし、このような遊離の低分子有機化合物の補酵素とは異なり、ペプチド鎖に直接結合したかたちで存在する一連の補酵素 (ビルトイン型補酵素と呼ぶ) が、1990 年代以降に、酸化還元酵素を始めとするさまざまな酵素中に相次いで発見されてきた。すなわち、銅アミン酸化酵素のトパキノン (TPQ) やガラクトース酸化酵素のチロシルチオエーテルなどに代表される新規な共有結合型補酵素である。ビルトイン型補酵素は、各酵素の遺伝子中では通常のアミノ酸残基あるいは翻訳終止コドンとしてコードされており、前駆体アミノ酸残基が何らかのタンパク質の翻訳後修飾を受けたり、終止コドンが特異的機構により新奇なアミノ酸として読み取られたりすることで、触媒反応に必須の補酵素に変換される。例えば、銅アミン酸化酵素の TPQ はチロシン残基として、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) の CTQ はシステイン残基とトリプトファン残基としてそれぞれ翻訳された後、翻訳後修飾を受けて補酵素型に変換される。申請者の所属する研究室では、これまでに細菌の銅アミン酸化酵素を用いて TPQ の銅イオン依存的な自己触媒的生成機構 (*J. Biol. Chem.* **270**, 4712-4720, 1995) や TPQ 生成過程における活性部位の構造変化 (*Nature Struct. Biol.* **9**, 591-596, 2002) を世界に先駆けて明らかにしてきた。一方、2 種類のグラム陰性細菌のペリプラズムに存在する QHNDH についても立体構造解析を行い、新規キノ補酵素 CTQ を同定することに成功した (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14268-14273, 2001; *J. Biol. Chem.* **277**, 2830-2834, 2002)。さらに、ヘテロ 3 量体構造をもつ同酵素は、そのサブユニットのひとつ (サブユニット) が、CTQ 以外にシステイン残基の硫黄原子とアスパラギン酸やグルタミン酸残基のメチレン炭素との間に新奇な分子内チオエーテル架橋構造を 3 ヶ所も含む極めて特異なタンパク質構造を有する。このような 2 つの特徴的な翻訳後修飾を含む サブユニットの形成を含め、活性のある QHNDH 酵素複合体全体がどのように生合成されているのかは、ほとんど未解明に残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、QHNDH の CTQ 補酵素がタンパク質の翻訳後にどのような機構で生合成されるかを中心に、種々の生化学的、分子生物学的研究手法を駆使して QHNDH の生合成プロセスを明らかにすることを主な目的とした。QHNDH の生合成機構は極めて複雑で、3 種類の異なるサブユニットの構造遺伝子に挟まれてコードされている鉄硫黄クラスター結

合ラジカル SAM タンパク質 (QhpD) の関与が明らかになった (*J. Biol. Chem.* **281**, 13672-13684, 2006) もの、CTQ の生成機構 (cofactor biogenesis) を含む QHNDH の生合成プロセスの詳細はほとんど未解明に残されていた。本申請研究においては、さらに別のタンパク質の関与が推定される複雑な

サブユニットの構造形成機構およびペリプラズム移行機構、ペリプラズムにおけるヘム結合や複合体形成機構を解析することで、ビルトイン型キノ補酵素含有酵素の生合成プロセスの全容を統合的に明らかにすることを目的とした。さらに、化学的に困難な反応を触媒する QhpD をはじめとする修飾因子 (酵素) や基質となる サブユニット前駆体の生化学的解析、両者のタンパク質間複合体の結晶構造解析を行うことにより、多段階の翻訳後修飾反応からなる QHNDH 生合成プロセスの構造的基盤に基づいた解明を目指した。

### 3. 研究の方法

QHNDH に含まれるビルトイン型キノ補酵素 CTQ および分子内チオエーテル架橋構造の形成機構を解明するため、オペロン中に含まれる遺伝子およびそのオペロン周辺において保存性の高い遺伝子について以下の実験を行う。まず、相同組換えにより各遺伝子を破壊し、各々の QHNDH 生合成に及ぼす影響を調べる。各遺伝子が QHNDH の活性発現に必須であることが判明すれば、プラスミド上に組み込んだ遺伝子を補給することで酵素活性が回復するかどうかを検討する。また、各遺伝子産物および各サブユニットの細胞内局在をウェスタンブロット法により調べるとともに、各種変異型酵素の作製と質量分析計を用いる各サブユニット・ポリペプチドの翻訳後修飾の解析などを行う。必須性が明らかになった遺伝子については、それぞれクローン化および大腸菌内での高発現系を構築し、大量精製して生化学的性質を調べるとともに、結晶化条件を検討し立体構造解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1)QHNDH の生合成に必須な遺伝子の同定

蓄積したゲノムデータの解析により 50 種以上のグラム陰性細菌が QHNDH をもつことが判明した。発現解析の結果、QHNDH の構造遺伝子は近傍の遺伝子とともにポリシストロン性のオペロンを構成することが明らかになり、それらをまとめて *qhp* 遺伝子と命名した。*qhp* 遺伝子は *qhpGADCBEFR* の順でゲノム上に存在し、*qhpADCB EF* についてはオペロンを構成している。一方、*qhpG* と *qhpR* はオペロンとは逆の方向を向いている。*qhpABC* は、それぞれ、サブユニットをコードするが、同オペロン内の *qhpD* はラジカル SAM タンパク質をコードし、サブユニット内のチオエーテル架橋形成を担う (詳細は(3)参

照) *qhpE* はサチライシン様プロテアーゼをコードし、サブユニットの N 末端の 28 残基のリーダー配列の切断除去を行う (詳細は (2) 参照)。新たな解析により、*qhpFGR* も他の *qhp* 遺伝子と同様に QHNDH の生合成に必要不可欠であり、QHNDH もほぼ全ての生物種で保存されていることが明らかになった (図 1)。QhpF は排出型 ABC 輸送体ファミリーに属し、ATP の加水分解と共役して基質を外部に輸送していると考えられる。QHNDH はペリプラズムに誘導生成されるが、サブユニットだけがペリプラズム移行シグナルを持たないため、QhpF がサブユニットの膜輸送を担うと推定される。QhpG は FAD 依存性のモノオキシゲナーゼファミリーに属し、トリプトファンのインドール環のハロゲン化酵素とも相同性をもつことから、CTQ 生合成時のインドール環への酸素添加に関与すると考えられる。QhpR については、AraC ファミリーに属す転写制御因子である。QHNDH は基質アミン存在下でのみ誘導生成されるが、この転写活性化を QhpR が担っていることを明らかにした。さらに、*qhp* 遺伝子のデータ解析により、QHNDH は数多くのグラム陰性菌だけではなく、一部のグラム陽性菌にも存在することが判明した (学会発表、雑誌論文)。

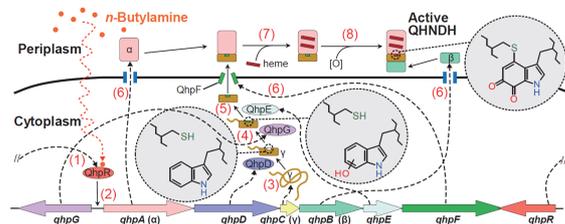


図 1 *qhp* 遺伝子と QHNDH 生合成の推定経路

## (2) 奇妙な使い捨て型のサチライシン様プロテアーゼ QhpE

*qhpE* の遺伝子破壊株を作製し QHNDH 生成に及ぼす影響を調べたところ、*qhpD* 破壊株と同様に、QHNDH の酵素活性が全く消失しただけでなくサブユニットは細胞質内に蓄積していた。また、この蓄積したサブユニットは、分子内チオエーテル架橋構造を有する一方、28 残基の延長配列も保持していた。*qhpE* 破壊株に *qhpE* 遺伝子をプラスミドで補充したところ、サブユニットは野生株と同様にペリプラズムへ移行し、活性のある QHNDH が生産された。これらの結果より、*qhpE* も QHNDH 生合成に必須であり、QhpE はサブユニットの 28 残基のリーダー配列の切断除去を行うプロテアーゼであると結論した。さらに、サブユニットの N 末端リーダー配列の一部に相当する 7 アミノ酸残基からなる合成ペプチドの N 末端および C 末端を蛍光標識し、大腸菌で発現させた QhpE と一夜反応させた。その結果、反応液の逆相 HPLC により両ペプチドの加水分解産物が同定できた。その切断部位はサブユニットの N 末端延長配列の切

断部位と一致した。また、この加水分解反応は非常にゆっくりと進行し、ほとんどターンオーバーしないことが判明した。一方、N 末端蛍光標識ペプチドと QhpE の反応液を SDS-PAGE で分析した結果、QhpE バンドに蛍光が検出された。この反応後の QhpE をトリプシンで消化し蛍光ペプチドを HPLC で単離した後、MALDI-TOF 質量分析すると、N 末端蛍光標識ペプチドの分解産物と QhpE の活性中心セリン残基を含むペプチドが含まれていた (図 2)。このことは、N-末端蛍光標識ペプチドが QhpE により加水分解された後、アシル-酵素中間体として QhpE の活性中心セリン残基に結合したままとどまっていることを示唆している。以上の結果より、QhpE はサブユニットに対しほぼ 1 対 1 で機能する非常に奇妙な使い捨て型のプロテアーゼであると考えられる (雑誌論文)。

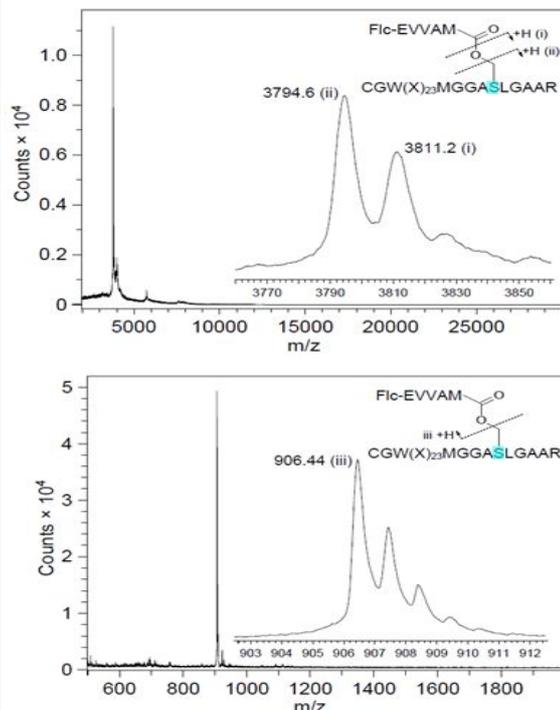


図 2 MALDI-TOF MS によるアシル-酵素中間体の同定

## (3) ラジカル SAM ファミリータンパク質 QhpD の構造機能解析

His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させた QhpD は Ni キレートカラムを用いて精製した。QhpD の鉄硫黄クラスターは空気酸化により容易に分解されることが判明したので、精製および以降の解析は嫌気チャンパー内で行う必要があった。大腸菌発現系では、QhpD 単独で発現させた場合よりも QhpD を QHNDH のサブユニット (QhpC) と共発現させることにより、発現量が飛躍的に上昇した。サブユニットとの複合体として嫌氣的に精製した QhpD は、鉄硫黄クラスターに特徴的な黄褐色を呈していたが、空気にさらすと速やかに白濁し沈殿した。可視紫外吸収スペクトルおよび電子スピン共鳴スペクトル測

定により、QhpD が[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを含有することが明らかになった。一方、種々の短縮型 サブユニット(His タグ付き)と QhpD (His タグなし)とを大腸菌内で共発現させ、Ni カラムを用いたプルダウンアッセイを行ったところ、リーダー配列及びチオエーテル架橋を形成する最初の Cys/Asp 残基を含む N 末端 51 残基だけでも、サブユニット全長の場合と同等に安定な QhpD 複合体が高収量で得られ、この領域が複合体形成に重要であることが判明した(学会発表)。次に、鉄硫黄クラスターの再構成反応条件について検討を加えた結果、QhpD によるサブユニットペプチド内架橋形成反応を 80%以上の架橋率で進行させることに成功した。架橋形成の有無は SH 基をヨードアセトアミドで処理した後、質量分析により判定するとともに、新たな方法として、蛍光標識試薬 *N*-(9-acridinyl)maleimide (NAM) で処理した後に SDS-PAGE を行うことで迅速かつ定量的な QhpD の活性測定が可能になった。さらに、架橋形成反応の進行に伴って生じる *S*-adenosylmethionine (SAM) の分解産物のひとつを 5'-デオキシアデノシンと同定した。さらに、変異型 サブユニットを用い、架橋形成には Cys および Asp または Glu が必要でありそれ以外の残基では代用できないことを証明した(学会発表)。次に、QhpD によるサブユニット分子内チオエーテル架橋形成の反応機構を解明するため、マルチサイトの架橋形成反応を解析した。N 末端 His タグ融合 QhpD は C 末端 Strep タグ融合 サブユニット(短縮型(-28~23)および全長型(-28~82))との複合体として大腸菌で発現させ、Ni キレートカラム及び Strep-Tactin カラムを用いて精製した。基質として、サブユニットの短縮型ペプチドを用いた場合、反応は、SAM および還元剤( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )の存在下でほぼ一次反応( $k = 0.05 \text{ min}^{-1}$ )に従って進行した。一方、全長型 サブユニットを用いた場合には、経時的に 3 ヲ所まで架橋が形成された。さらに、架橋を構成する酸性残基へ変異導入した全長 サブユニットを用いて解析したところ、3 番目の架橋部位変異体(D49N)では他の 2 ヲ所で架橋が形成されたのに対し、1 番目の架橋部位変異体(E16Q)では 3 ヲ所とも架橋は形成されなかった。これらの結果より、QhpD タンパク質はサブユニットの N 末端側から順に 3 ヲ所の架橋を形成すると推定される(学会発表)。

#### 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)

Tadashi Nakai, Takafumi Deguchi, Ivo Frebort, Katsuyuki Tanizawa, Toshihide Okajima, Identification of Genes Essential for the Biogenesis of

Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase, *Biochemistry*, 査読有, Vol.53, No.5, 2014, pp. 895-907, DOI:10.1021/bi401625m

中井 忠志, キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に必須の奇妙なプロテアーゼ、生産と技術、査読無、64 巻、4 号、2012、pp. 37-39、URL: <http://www6.ocn.ne.jp/~seisan/644/644-37.pdf>

Tadashi Nakai, Kazutoshi Ono, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Toshihide Okajima, An unusual subtilisin-like serine protease is essential for biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol.287, No. 5, 2012, pp. 6530-6538, DOI:10.1074/jbc.M111.324756

[学会発表](計 4 件)

中井 忠志, ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素によるマルチサイト架橋形成反応の解析、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

中井 忠志, キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に必須なペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素の機能解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

出口 貴文, キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成における周辺遺伝子の役割、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

伊藤 寛人, キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に必須な鉄-硫黄クラスター結合タンパク質の構造と機能、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 忠志 (NAKAI, Tadashi)  
大阪大学・産業科学研究所・助教  
研究者番号: 03333440

(2) 研究分担者

谷澤 克行 (TANIZAWA, Katsuyuki)  
大阪大学・産業科学研究所・招へい教授  
研究者番号: 20133134