

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07391

研究課題名(和文)キノン補酵素形成に関する新規トリプトファン水酸化酵素の精密反応解析

研究課題名(英文) Reaction mechanism of novel tryptophan-hydroxylating enzyme involving in quinone cofactor biogenesis

研究代表者

岡島 俊英 (Okajima, Toshihide)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：10247968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に関わるFAD含有モノオキシゲナーゼQhpGの反応機構と立体構造を解析し、ペプチド環状化などペプチド工学としてのツールとしての可能性を示すことを目的とした。解析の結果、試験管内反応系の構築に成功するとともに、質量分析によって反応生成物を明らかにした。他の修飾酵素との複合体形成が反応の進行に重要であった。さらに、X線結晶構造解析にも成功して、ペプチド上の特定のTrp残基を認識し、酸化修飾する機構の詳細についても解明することができた。

研究成果の概要(英文)：We have studied the reaction mechanism and X-ray crystal structure of FAD-dependent monooxygenase QhpG that is involved in the cofactor biogenesis of bacterial quinohemoprotein amine dehydrogenase. Our final aim is application of QhpG for a novel tool for peptide engineering. In vitro reaction system for QhpG provided the important information for the chemical structure of the QhpG reaction product. On the basis of X-ray crystal structure of QhpG, we have elucidated the QhpG reaction mechanism including the recognition of the specific Trp residue on the substrate peptide.

研究分野：酵素反応科学、構造生物学

キーワード：キノン補酵素 FAD オキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

高等動物から細菌にいたるまで、生物は様々な生理活性あるいは機能性を有する低分子ペプチドを生産している。リボゾーム・非リボゾーム生合成系によって作り出された低分子ペプチドの多くは、各種官能基の付加や架橋化など様々な修飾を受け、その多くは、ペプチドの構造形成、標的への結合能、抗菌性、および触媒能などの機能発現に必須である(*Science* 2004,303,1805)。これまでに研究代表者らは、アミノ酸残基の翻訳後修飾によりペプチド上に作り出される共有結合型補酵素の形成機構を詳細に解明してきた。その過程で、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) をコードする *qhp* オペロン (*qhpGADCBEFR*) に、9 Da ペプチド (QhpC, QHNDH γ サブユニット) の生合成に関与する3つのペプチド修飾酵素が存在することを明らかにした。リーダー配列とともに翻訳された γ サブユニットは、まずラジカル SAM 酵素 (QhpD) により3ヶ所のチオエーテル結合で架橋された後、セリンプロテアーゼ (QhpE) によってリーダー配列が除去される。さらに、架橋ペプチド上に、QhpG および QhpA (QHNDH α サブユニット) の作用によって補酵素 cysteine tryptophylquinon (CTQ) が形成され、 γ サブユニットは QHNDH の反応中心となる。同様に前駆体ペプチドから多段階の修飾を経て生合成される補酵素として、ピロロキノリンキノン (PQQ) も知られている (*Biochemistry* 2012, 51, 2265)。興味深いことに、 γ サブユニットや PQQ の生合成系は、sactipeptide などの抗菌性低分子ペプチド (*Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17, 605) の生合成系とも類似していた。これらのペプチド修飾および補酵素生合成酵素は、同じ祖先から分子進化してきたのかもしれない。また、ペプチド修飾酵素をペプチド改変ツールとして利用することも期待されるが、すでに、研究代表者らは、架橋酵素 QhpD に関して、その架橋形成能を利用し、任意の配列を含む環状ペプチドを構築すること試みている (挑戦的萌芽、平成 24~26 年度)。

本研究計画では、 γ サブユニット修飾酵素 QhpG に着目したい。これまでの解析の結果、本タンパク質は FAD を補酵素として含有する 47 kDa のモノオキシゲナーゼであることが判明している。架橋形成された γ サブユニットを基質として、その Trp 残基の側鎖インドール環のおそらく7位を水酸化し、QHNDH の CTQ 補酵素を作り出す初発反応を引き起こすと考えている。先行実験において、実際に、QhpG を大腸菌で発現させると、FAD 複合体として精製された。CTQ に類似した補酵素としてメチルアミン脱水素酵素の補酵素 tryptophan trypto-phyllquinone (TTQ) が知られているが、その生合成の初期反応は、同じよ

うに Trp 残基7位の水酸化であることが判明している (*Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13, 469)。ただ、その反応を触媒する酵素が、長年の間の探索によっても全く見つかっていない。また、ごく最近、日本およびスペインの研究グループが独立して、海洋性細菌に由来した Lys オキシダーゼ (LodA) の活性中心に補酵素 CTQ が存在することを見出した (*J. Biochem.*, 2013, 154, 233; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 2981)。QHNDH とドメイン構成やアミノ酸配列において全く相同性がないにもかかわらず、どのように CTQ が生合成されているのか興味を持たれている。これまでに LodA と隣接する FAD 酵素である LodB が関与することが判明しているが、その詳細も依然として不明である。

2. 研究の目的

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) の生合成を制御する *qhp* オペロンは、酵素サブユニット以外にも FAD 含有モノオキシゲナーゼをコードする *qhpG* 遺伝子を含んでいる。QhpG タンパク質は、QHNDH の低分子量 γ サブユニットにおいて、Trp 残基側鎖インドール環を特異的に水酸化し、キノン補酵素形成の初発反応を引き起こす可能性がある。本研究では、この新規なペプチド修飾酵素について、詳細な反応機能解明を行う。反応開始時の電子伝達機構について解明したい。本酵素は、環状化を引き起こすペプチド修飾ツールとして応用できる可能性があり、ペプチド上の特定の Trp 残基を認識する機構の詳細についても、基質複合体モデル構造をもとに理解したい。

3. 研究の方法

まず今後の解析の基盤となる 試験管内反応系の構築と 基質フリーの状態の結晶構造解析を優先的に行う。その後構築した試験管内反応系を用いて、詳細な反応機構の解明を行う。また、X線結晶構造解析による構造情報をもとに基質ペプチドの認識機構を解明し、結合部位への変異導入によって配列特異性の改変を試みる。これまでに *Pseudomonas putida* QhpG (PpuQhpG) の大腸菌発現系を構築している。N 末端に (His)₆-TEV プロテアーゼ切断配列が付加しており、ニッケルキレートカラムによる精製の後、TEV プロテアーゼによって付加配列を除去している。さらに、予備的な結晶化スクリーニングの結果、PpuQhpG の微小な板状単結晶を得ており、X線回折の結果、2.7 Å 分解能のデータセットを得ている。これらの先行実験の成果を出発点として、研究を実施した。

4. 研究成果

(1) 架橋形成 QhpC の調製

PpuQhpG の基質となりうる架橋された PpuQhpC を調製した。これまでは *P. denitrificans* 由来の QhpD および QhpC におい

て、架橋の形成を行なってきたので、その方法を *Ps. putida* QhpD と QhpC にも当てはめた。しかしながら、同様の反応条件では、一部は 3ヶ所の架橋が形成されるものの不完全であった。様々な反応条件を検討した結果、Ppu QhpG 存在下においては、QhpD による架橋形成が効率的に起きることが判明した。なお、*P. denitrificans* QhpD/QhpC における架橋形成は、QhpG に依存しないので、この QhpG による架橋形成の促進効果は、由来する細菌種に依存するものと考えられた。

(2) 試験管内反応系の構築

ジチオナイト還元による反応は、single turnover である上、嫌気条件下で酸素を徐々に加えていく必要があり、反応機構の解析には不向きである。そこで、共役して電子伝達を行うシステムを構築する。具体的には、シトクロム b5 還元酵素、NADH、およびフェノサフラニンなどの電子伝達色素を加え、還元された色素を介して、大気条件下でも PpuQhpG の FAD が連続的に還元されるようにした。実際の FAD 還元反応は、FAD 由来の可視吸収が消失することによって明らかであった。

次に全長の QhpC にも基質となるペプチドについて検討した。その結果、先行実験で QhpC の CTQ 形成部位の部分配列ペプチドを用いて、酸化修飾反応が起きたと考えていたが、MS/MS 解析の結果、修飾部位が Trp43 残基ではないことが判明した。さらに、前出の FAD 還元系では酸化修飾反応が起らないことがわかった。そこで、再度、全長架橋 QhpC を用いて、何らかの修飾反応が起きないかどうか解析した。その結果、PpuQhpG および還元系存在下においても、質量変化は全く何にも修飾反応が起きていないことが判

明した。そこで、何らかの添加物（金属イオンなどを含む）の必要性の有無など各種の反応条件を検討した。その結果、PpuQhpD が共存すると、還元系存在下で、PpuQhpG による修飾反応がおきることが判明した。反応産物を Asp-N プロテアーゼで消化後、MALDI-TOF 質量分析装置で解析した結果、CTQ に変換される領域を含むペプチドに +32 の質量増加があり、2 原子の酸素の導入があるものと考えられた (Fig. 1)。さらに、MS/MS 解析の結果、Trp43 を含むチオエーテル架橋ループ内に修飾部位があることが判明した。少なくとも、酸化を受けやすい Met 残基ではなく、Trp43 が 2 箇所の水酸化を受けている可能性が示唆された。

(3) QhpC-QhpD-QhpG 間の相互作用の解析

(1)および(2)の結果は、QhpC-QhpD-QhpG 間で何らかの相互作用があり、溶液中で複合体を形成している可能性を示唆している。そこで、そのことを調べるために、Native 電気泳動において、相互作用の有無を解析した。その結果、架橋 QhpC-QhpG、未架橋 QhpC-QhpG 間、さらには、架橋 QhpC-QhpD-QhpG の三者間でも相互作用があることがわかった。すなわち、QhpC-QhpD-QhpG が翻訳後に三者複合体を形成し、それによって、QhpD による架橋形成と QhpG による Trp43 の修飾反応が起きることがわかった。

(4) 結晶構造解析

先行実験で調製された PpuQhpG 結晶は、微細な板状結晶であり、まず、その結晶化条件の最適化を試みた。しかしながら、引き続き、沈殿しやすさ、結晶形成にかかる期間が 6 ヶ月かかるなど難航した。そこで、最適化は一旦断念し、位相決定を先行させることにした。ただ、SeMet 標識はタンパク質の発現量が大幅に低下したため、重原子ソーキングによる位相決定を試みた。各種の重原子化合物をスクリーニングした結果、5 mM carbon tetra (acetoxymurcuride) を含むクライオ溶液によってソーキングしたとき、結晶の回折データを精査したところ、差パターンマップ上で、重原子ピークを見出した。最終的に SIRAS 法によって、位相を決定することができた。得られた初期位相をもとに、tryptophylquinone cofactor の生合成に参与する FAD 依存性 oxygenase として初めての立体構造を決定することに成功した (Fig. 2)。

全体構造は、N 末端側大ドメインと C 末端側小ドメインから構成されており、Flexible linker によって連結されていた。N 末端側大ドメインと C 末端側小ドメインの間にもう一方の小ドメインが入り込み、二量体が形成されていた。N 末端側大ドメインは FAD 結合触

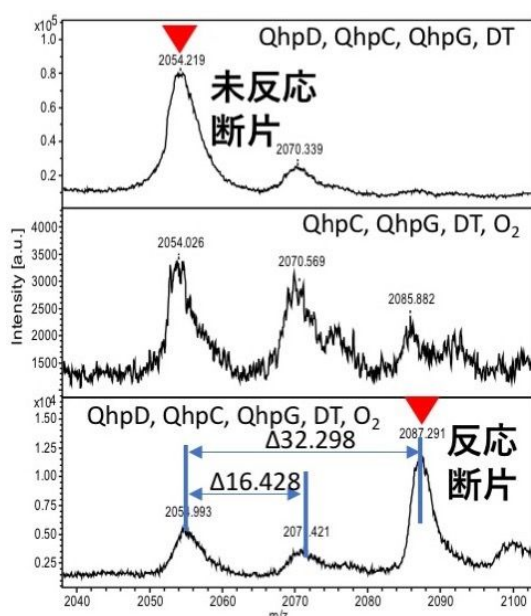


Fig. 1. QhpG 反応物の質量分

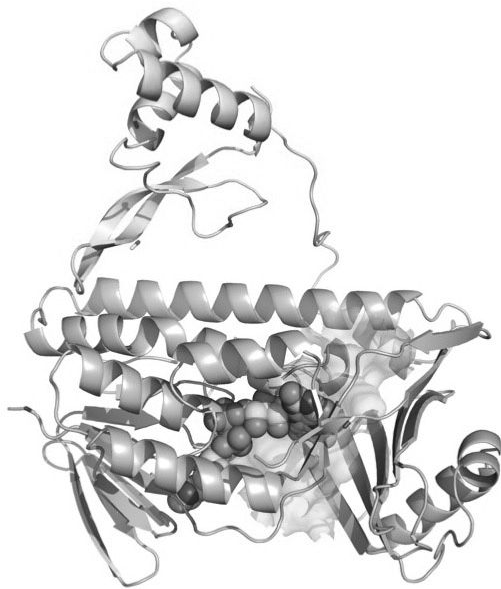


Fig. 2. QhpG の結晶構造

媒ドメインであり、FAD-dependent monooxygenase およびハロゲナーゼと構造的に高い相同性を示した。触媒ドメインは Rossmann fold を含み、FAD は 2 つの lobe の間に結合していた。触媒ドメインと小ドメイン囲まれた内側に、プラスにチャージし保存性が高い領域があり、基質となる QhpC の結合部位であると考えられた。そこに QhpC を結合させたモデルを構築すると、FAD 近傍に Trp43 が位置することがわかった。すなわち、QhpG の反応機構は、FAD と Trp43 との間の直接的な反応によるものであると考えられた。相同性が高いハロゲナーゼのように、反応性の分子が生成し、それが基質と反応するような機構ではなかった。すなわち、他の FAD 依存性モノオキシゲナーゼと同様に、還元型 FAD が酸素分子と反応して形成される C4a-hydroperoxy-FAD から、酸素原子が転移して Trp43 側鎖インドール環の水酸化反応が起きることが推定された。おそらく、6,7 位二重水酸化は同じ反応を繰り返されているために起きていると推定される。

このように推定された反応機構と QhpC/QhpG 結合モデルを確かめるために、複数の変異型 QhpG を作成して QhpC との相互作用ならびに水酸化活性を調べた。その結果、分子表面の正電荷を消失させると、QhpC の結合性が減少した。さらに FAD 近傍で QhpC の結合に重要と考えられた残基を変異させると、QhpG の活性が消失した。以上の結果は、結合モデルと予測している反応機構を裏付けるものであった。

(5)推定される CTQ 形成機構

反応生成物の質量分析の結果から、補酵素 CTQ の形成は、まず QhpD によって架橋され

た QhpC が QhpG によって、CTQ 前駆体である Trp43 のインドール環を二水酸化する(6,7-水酸化)。さらに、そのまま QhpE によってリーダーペプチドが切断され、ペリプラズムに輸送される。最終的に、ヘムを含有する QhpA あるいは自発的な酸化によって Trp43 と Cys37 が架橋、6,7-水酸化インドール環が酸化されることによるものと推測された。

(6) 水酸化 Trp 含有 QhpC の環状化・CTQ 形成実験

QhpG による生成物である 6,7-水酸化 Trp 含有 QhpC を用いて、環状化実験を行った。想定されるペリプラズムの環境である酸化的条件を作り出すため、大気下で酸化剤としてフェリシアン化カリウムを添加した。各種の条件を検討したが、環状化・CTQ 形成は、質量分析やキノン染色などでは観測されなかった。おそらく、酸化剤ではなく QhpA との結合およびヘムを介した酸化が、CTQ 形成に重要であるものと考えられた。また、QhpC の QhpG からの完全な解離も反応に必要な可能性が高いことが考えられた。

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 3 件)

2 中井忠志、谷澤克行、岡島俊英、ペプチドを分子内架橋する新規ラジカル SAM 酵素、*生化学*、2016, 88(4), 506-510
DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880506

Takeshi Murakawa, Akio Hamaguchi, Shota Nakanishi, Misumi Kataoka, Tadashi Nakai, Yoshiaki Kawano, Hiroshi Yamaguchi, Hideyuki Hayashi, Katsuyuki Tanizawa and Toshihide Okajima, Probing the catalytic mechanism of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* with halide ions. *J. Biol. Chem.* 2015, 290 (38), 23094-23109. 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M115.662726

Tadashi Nakai, Hiroto Ito, Kazuo Kobayashi, Yasuhiro Takahashi, Hiroshi Hori, Motonari Tsubaki, Katsuyuki Tanizawa, and Toshihide Okajima, The radical S-adenosyl-L-methionine enzyme QhpD catalyzes sequential formation of intra-protein sulfur-to-methylene carbon thioether bonds. *J. Biol. Chem.*, 290(17), 2015, 11144-11166. 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M115.638320

〔学会発表〕(計 27 件)

岡島俊英、中井忠志 他、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素補酵素含有サブユニットの多段階翻訳後修飾の分子機構、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、ワークショップ：多様な微生物に見出したユニークな細

胞・酵素機能とその応用 2017年12月6-9日、神戸(口頭)

大関俊範、中井忠志、岡島俊英 他、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素のキノ補酵素含有サブユニットの翻訳後修飾機構、2017年酵素・補酵素研究会、2017年6月23日-24日、仙台、(口頭およびポスター)

Toshihide Okajima, Multi-step posttranslational modification of a cofactor-containing small subunit constituting quinoenzyme. Kickoff Meeting (JSPS Symposium) for the ZIAM/GBB and ISIR/IPR collaboration, Oct 27, 2017, Groningen, Nederland (Poster)

大関俊範、中井忠志、岡島俊英 他、トリプトフィルキノ補酵素生合成に関与するFAD依存性オキシゲナーゼの機能解明、日本農芸化学会関西支部例会(第499回講演会)、2017年6月3日、京都(口頭)

大関俊範、中井忠志、岡島俊英、キノ補酵素生合成に関わるFAD依存性モノオキシゲナーゼ QhpG の分光学的特性と基質タンパク質 QhpC との相互作用、日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月17-20日、京都(口頭)

Toshihide Okajima, Tadashi Nakai, et al. X-ray crystallographic structure of semiquinone radical intermediate formed in bacterial copper amine oxidase. Fifth International Conference on Cofactors (ICC-05) & Active Enzyme Molecule 2016, Kurobe, Japan, September 4-8, 2016. (口頭)

Tadashi Nakai, Toshihide Okajima, et al. Mechanism of sequential formation of intrapeptidyl thioether cross-links by the radical SAM enzyme QhpD. Fifth International Conference on Cofactors (ICC-05) & Active Enzyme Molecule 2016, Kurobe, Japan, September 4-8, 2016. (口頭)

岡島俊英、中井忠志 他、ペプチドを分子内架橋するラジカルSAM酵素の反応機構、BMB2015、2015年12月4日、神戸(口頭)

中井忠志、岡島俊英 他、ペプチドの翻訳後修飾を触媒するラジカルSAMスーパーファミリー酵素、BMB2015、2015年12月1日、神戸(口頭)

中井忠志、岡島俊英 他、ラジカルSAM酵素 QhpD によるペプチド分子内チオエーテル架橋の連続的形成メカニズム、2015年度酵素補酵素研究会、2015年7月10日-11日、福井(口頭)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 俊英 (OKAJIMA, Toshihide)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：10247968

(2) 研究分担者

中井 忠志 (NAKAI, Tadashi)
大阪大学・産業科学研究所・助教(平成28年度より広島工業大学・生命学部・准教授)
研究者番号：00333344