

令和元年6月13日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07691

研究課題名(和文) 多段階翻訳後修飾を伴うアミン脱水素酵素の生成機構解明と多環状ペプチド創製への展開

研究課題名(英文) Mechanism of multi-step posttranslational modification involved in biogenesis of amine dehydrogenase and its application to development of bioactive polycyclic peptides

研究代表者

中井 忠志 (NAKAI, Tadashi)

広島工業大学・生命学部・准教授

研究者番号：00333344

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)：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)の生合成プロセスを解明することを目的として、qhpオペロン近傍遺伝子Pden\_1710の生化学的解析を行った。さらに、生理活性を有する新規な多環状ペプチドを創製することをもう一つの目的として、ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素QhpDの基質特異性解析を行い、様々な配列と架橋数を有する架橋ペプチドを作り出すツールとしてQhpDが有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素QhpDを用いてAla繰り返し配列の環状化と複数架橋形成に成功した。その結果、様々な配列と架橋数を有する架橋ペプチドを作り出すツールとしてQhpDが有用であることが判明した。以上の研究成果に基づいて今後QhpDの改変を行うことで、抗菌活性など様々な生理活性をもつ多環状ペプチドの開発に活用できると期待できる。

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, quinoxaline hemoprotein 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. We have biochemically analyzed one of the peripheral genes, Pden\_1710, that may be required for the QHNDH biogenesis. Furthermore, we have succeeded in formation of thioether cross-links using substrates with various sequences and multiple cross-linking sites. These results demonstrate that QhpD is useful for development of various polycyclic peptides.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：翻訳後修飾 補酵素の生合成 ラジカルSAM酵素 分子内チオエーテル架橋 環状ペプチド キノヘムプロテイン ヒルトイン型キノン補酵素 酵素触媒機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 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年代以降にさまざまな酵素中に発見されてきた。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ることで、触媒反応に必須の補酵素に変換される。研究代表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、前駆体チロシン残基から補酵素トパキノン（TPQ）が銅イオン依存的自己触媒的に生成する機構（引用文献①）やTPQ生成過程における活性部位の構造変化（引用文献②）を世界に先駆けて明らかにしてきた。一方、グラム陰性菌のペリプラズムに存在するキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素（QHNDH）の立体構造解析も行い、システインとトリプトファン残基から生成する新規キノン補酵素システイントリプトフィルキノン（CTQ）を同定することに成功した（引用文献③④）。さらに、 $\alpha\beta\gamma$ ヘテロ3量体構造をもつ同酵素は、最小の $\gamma$ 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カ所も含む極めて特異なタンパク質構造を有することも明らかにした。このような2つの特徴的な翻訳後修飾を含む $\gamma$ 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、大変興味深い問題である。QHNDHの生合成機構は極めて複雑で、3種類のサブユニットの構造遺伝子に隣接する5種類の遺伝子の関与をこれまで研究代表者らが明らかにしてきたが（引用文献⑤⑥⑦）、CTQの生成機構を含むQHNDHの生合成プロセスの詳細は未解明に残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、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新規ビルトイン型キノン補酵素CTQを含むQHNDHを対象として、シグナル配列の切断から、CTQや分子内架橋構造の形成、ヘムの挿入、ヘテロ三量体形成に至る多段階の翻訳後修飾反応によるQHNDHの生合成プロセスの全容を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、QHNDHの生合成に関わるペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素QhpDの研究代表者らの先行研究の成果を活用し、生理活性を有する新規な多環状ペプチドを創製することをもう一つの目的とした。

### 3. 研究の方法

QHNDHに含まれるビルトイン型キノン補酵素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った。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した。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った。必須性が明らかになった遺伝子については、それぞれクローニング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った。多環状ペプチドを形成する方法としては、量産化に成功しているQhpDを用いて、*in vivo* および *in vitro* の条件で行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *qhp* オペロン近傍遺伝子 Pden\_1710 の生化学的解析

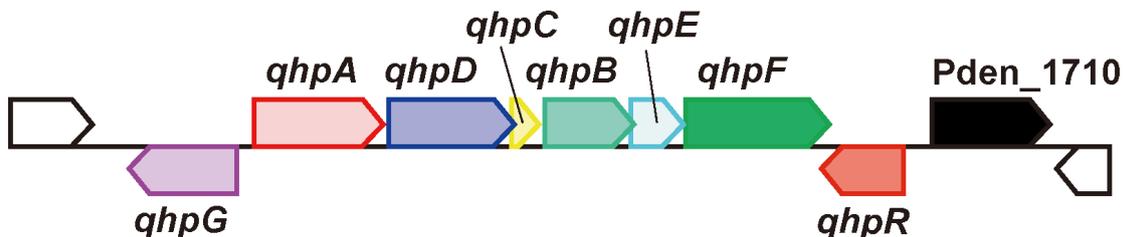


図1 *qhp* 遺伝子群と近傍遺伝子 Pden\_1710

*Paracoccus denitrificans* の機能未知遺伝子 Pden\_1710 は多くの細菌をもつアミン代謝系の一つキノヘムプロテインアミン脱水素酵素（QHNDH）とその成熟に関わる酵素の遺伝子群の中に共通して存在する（図1）。そのため、Pden\_1710は細菌のアミン代謝において重要な役割を担うことが推測される。Pden\_1710はアルデヒド脱水素酵素と相同性を示すが、その機能の詳細は明らかになっていない。Pden\_1710を発現、精製し立体構造解析によりその役割を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。まず、Pden\_1710の高発現プラスミド pET-Pden\_1710 を構

築した。pET-Pden\_1710 を用いて発現させた菌抽出液の SDS-PAGE の結果、目的タンパク質と同程度の長さのバンドを確認できた。発現条件については、1 mM IPTG による誘導を行った後、25°C でさらに 16~24 時間培養することが、Pden\_1710 の最良発現条件であることが判明した。Pden\_1710 は融合させた His タグを利用して Ni キレートカラムを用いて精製した。精製した Pden\_1710 試料の活性測定の結果を次に示す。①Pden\_1710 は NAD<sup>+</sup> の存在下で NADH を生成したが、NADP<sup>+</sup> の存在下では NADPH を生成しなかった。②①の条件にブチルアルデヒドを加えたところ、NAD<sup>+</sup> から NADH を生成する速度が減少した。③Pden\_1710 は NADH または NADPH の存在下では NAD<sup>+</sup> または NADP<sup>+</sup> を生成しなかった。④③の条件に酪酸を加えても NADH または NADPH の消費は見られなかった。以上の結果から、Pden\_1710 は NAD<sup>+</sup> および NADH を基質とする酸化還元酵素であり、その反応には NADP<sup>+</sup> および NADPH は代用できないことが判明した。また、QHNDH による生成物の一つであるブチルアルデヒドは基質としないことから、Pden\_1710 は直接アミン代謝に関わらない可能性が示唆された。

## (2) 新規環状ペプチドの開発に向けたラジカル SAM 酵素 QhpD の基質特異性解析

QhpD は S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) と鉄硫黄クラスターを用いて各種の難化学反応を触媒するラジカル SAM 酵素の一種であり、基質ペプチドの QhpC 内の特定の Cys 残基の硫黄原子と Glu または Asp 残基のメチレン炭素間に分子内チオエーテル架橋を 3 ヲ所形成する。3 ヲ所のチオエーテル架橋は、Cys が常に Glu/Asp の 6~9 残基前に存在し、架橋で生じるキラル炭素原子がすべて S 型の立体配置をとる共通性をもつため、QhpD の活性部位の立体構造が基質特異性を決定していると推定される。

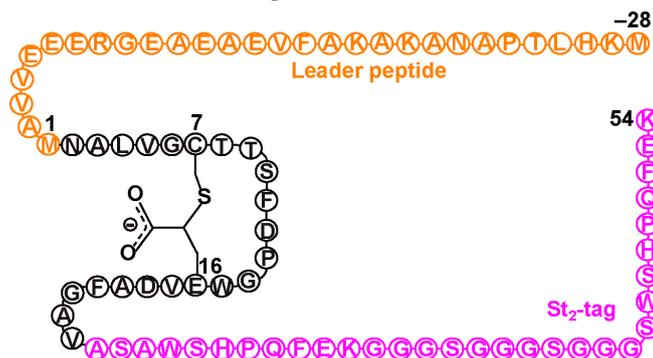


図2 sQhpC のアミノ酸配列と架橋部位の構造

研究代表者らはこれまでに *Paracoccus denitrificans* 由来の QhpD と QhpC を用いて *in vitro* 架橋反応系を確立し、SAM と還元剤 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) の存在下で QhpC 内に架橋を形成させることに成功した (引用文献⑤)。QhpC は N 末端側に 28 残基のリーダー配列と C 末端側に 3 ヲ所の架橋部位もつが、リーダー配列と 1 番目の架橋部位 (CTTSFDPGWE: 下線は架橋形成残基) のみの短縮型 (sQhpC) でも QhpD の基質となり、*in vitro* で架橋反応が進行する (図2)。sQhpC の Cys と Glu 残基が直接的に架橋反応を受けるが、両残基にはさまれた領域 (架橋ループと呼ぶ) の配列や長さを変更しても架橋が形成されるのかは不明である。また、一般的にペプチドは環状化により様々な生理機能が付与されることが知られており、ペプチドの分子内架橋により環状構造を形成する QhpD の触媒機構を詳細に解明することは、新規の機能性環状ペプチドを創出するためにも重要である。まず、QhpD の基質特異性を明らかにすることを目的として、複数の QhpC 変異体を用いて QhpD による架橋形成を調べた。N 末端 His タグ融合 QhpD は C 末端 Strep タグ融合 sQhpC との複合体として大腸菌で共発現させた後、嫌気的条件下で 2 種類のアフィニティカラムを用いて精製した。鉄硫黄クラスターを再構成した後、SAM と還元剤を加えて架橋反応を行い、質量分析により反応の有無を同定した。この際、Cys と Glu 残基間の架橋ループ (TTSFDPGW) の変異体を基質として活性を測定した。その結果、架橋ループを Ala 残基で 1~3 残基伸長した変異体 TTSFNAPGW, TTSFNAAPGW, TTSFNAAAPGW では、いずれも架橋が形成されなかった。一方、架橋ループを 5 残基に短縮した変異体 TTPGW では架橋形成が見られた。また、Pro 残基の Ala 変異体 TTSFDAGW、複数残基の変異体 (TTVSLPGW および RPNLLPGW) では、架橋が形成され形成速度はいずれも野生型の約 1/10 であった。以上の結果より、架橋ループが 5~8 残基であれば、任意の配列に変更しても反応速度は低下するものの架橋を形成できることが明らかになった (学会発表⑧)。

## (3) QhpD による環状ペプチド形成機構の解明: 基質配列長および配列許容性の解析

さらに sQhpC をベースとした各種コンストラクトを作成し、架橋形成部位間の配列長およびその配列特異性について検討した。まず、1 番目の架橋部位において保存性の高い 4 残基 (Asp, Pro, Gly, Trp) を Ala 残基に置き換え、残基の重要性を解析した。その結果、変異体 TTSFAPGW, TTSFDPAW, TTSFDPGA は野生型と同等の被架橋形成能を持つ一方で、変異体 TTSFDAGW は被架橋形成速度が野生型の 1/10 程度に低下していた。さらに、架橋ループを 8 残基に固定したランダム変異体を用いて解析を行ったところ、ある程度の配列許容性があることを見出した。次に、架橋ループの長さに着目し、複数の変異体を基質として活性を測定した。その結果、架橋ループの長さを任意の配列や Ala のみの配列で 2, 3, 4, 5, 7, および 8 残基に短縮すると架橋が形成されるが、9 残基以上に伸長すると架橋が形成されることが判明した (学会発表③)。

#### (4) QhpD による Ala 繰り返し配列の環状化と複数架橋形成

引き続き sQhpC をベースとして、Ala のみから形成された架橋配列の被架橋形成能、および連続した架橋の形成能について解析した。まず、sQhpC 上に、1 から 10 残基の Ala 残基のみの架橋ループを導入した。QhpD を用いて反応させた結果、すべてで架橋が形成されることがわかった。さらに、架橋ループを完全に欠失させても、架橋形成されることがわかった。これらの結果は、架橋形成に関して QhpD が架橋ループと特異的相互作用を必要としないループアウトモデルを支持した。興味深いことに、Ala ループは金属イオンを結合するイオノフォア型構造を取りうるということが構造計算の結果から予想されており、その詳細も現在解析している。さらに、連続的な架橋形成能を調べるために、全長 QhpC の配列を繰り返し、6 あるいは 9 か所の架橋部位を導入した QhpC 変異体を作成した。QhpD による反応の結果、前者ではすべて、後者でも 8 ヶ所以上の部位で架橋形成されることが示された。すなわち、QhpD は野生型 QhpC を超える架橋数をもつペプチドを作り出すことも可能であった。これらの結果から、QhpD が様々な配列と架橋数を有する架橋ペプチドを作り出すツールとして有用であることが示された (学会発表②)。

#### 〈引用文献〉

- ① Y. H. Choi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 4712–4720 (1995).
- ② M. Kim *et al.*, *Nature Struct. Biol.*, **9**, 591–596 (2002).
- ③ A. Satoh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 2830–2834 (2002).
- ④ S. Datta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 14268–14273 (2001).
- ⑤ T. Nakai *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **290**, 11144–11166 (2015).
- ⑥ T. Nakai *et al.*, *Biochemistry*, **53**, 895–907 (2014).
- ⑦ T. Nakai *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6530–6538 (2012).

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① 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, 査読無, 88 巻, 4 号, 2016, pp. 506-510  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880506

##### 〔学会発表〕 (計 1 2 件)

- ① 大関 俊範, キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の活性中心サブユニット合成に関与するセリンプロテアーゼの機能解析, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年
- ② 大関 俊範, ラジカル SAM 酵素 QhpD のペプチドチオエーテル架橋形成反応による Ala 繰り返し配列の環状化と複数架橋形成, 第 91 回 日本生化学会大会, 2018 年
- ③ 小酒井 一輝, ペプチド・チオエーテル架橋形成酵素 QhpD による環状ペプチド形成機構の解明: 基質配列長および配列許容性の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年
- ④ 小酒井 一輝, 新規環状ペプチドの創出に向けたラジカル SAM 酵素 QhpD の架橋形成配列長および配列特異性の解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年
- ⑤ 岡島 俊英, 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, 2017 年
- ⑥ 小酒井 一輝, ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素 QhpD における架橋形成配列長および配列特異性の解析, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017 年
- ⑦ 小酒井 一輝, 分子内チオエーテル架橋を形成するラジカル SAM 酵素 QhpD の基質特異性解析, 第 17 回日本蛋白質科学会年會, 2017 年
- ⑧ 小酒井 一輝, 新規環状ペプチドの開発に向けたラジカル SAM 酵素 QhpD の基質特異性解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年
- ⑨ Kazuki Kozakai, Analysis of substrate specificity of intrapeptidyl thioether bond forming radical SAM enzyme QhpD, The 20th SANKEN International The 15th SANKEN Nanotechnology Symposium, 2016 年
- ⑩ Tadashi Nakai, Reaction mechanism of interpeptidyl thioether cross-links by radical SAM enzyme QhpD, The 20th SANKEN International The 15th SANKEN Nanotechnology Symposium, 2016 年
- ⑪ 小酒井 一輝, ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素 QhpD の基質特異性解析, 第 89 回 日本生化学会大会, 2016 年
- ⑫ Tadashi Nakai, Mechanism of sequential formation of intrapeptidyl thioether cross-links by the radical SAM enzyme QhpD, 5th International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016, 2016 年

##### 〔その他〕

ホームページ等

生体分子反応科学研究室

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：岡島 俊英

ローマ字氏名：(OKAJIMA, Toshihide)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：産業科学研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10247968

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：大関 俊範

ローマ字氏名：(OOZEKI, Toshinori)

研究協力者氏名：小酒井 一輝

ローマ字氏名：(KOZAKAI, Kazuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。