

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05924

研究課題名(和文) グルコシド-3-脱水素酵素オペロン中の機能未知のタンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of unknown proteins coded in glucoside -3- dehydrogenase operon

研究代表者

津川 若子 (Tsugawa, Wakako)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80376871

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)：多くの糖類脱水素酵素と異なりG3DHは糖の3位を酸化する特異な酵素であるため特殊な糖の計測、合成などの応用研究が進められてきたが構造や機能に関する情報は乏しかった。G3DHは酵素反応を触媒するSubIサブユニットと、機能不明のSubIIサブユニットからなる。またゲノム上ではこれらをコードする遺伝子の下流にORF3蛋白の配列がある。

本研究の結果subIでは糖を酸化し、放出された電子が補酵素のFAD、3Fe4S型の鉄硫黄クラスタを経て、シトクロムcであるORF3へと授受されることを解明した。一方SubI,IIの結合が酵素の安定化に重要と考え検討したが結合に関わるアミノ酸残基は特定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの糖類脱水素酵素と異なりG3DHは糖の3位を酸化する特異な酵素であるため特殊な糖の計測、合成などの応用研究が進められてきたが構造や機能に関する情報は乏しかった。

G3DHは酵素反応を触媒するSubIサブユニットと、機能不明のSubIIサブユニットからなる。またゲノム上ではこれらをコードする遺伝子の下流にORF3蛋白の配列がある。

本研究の結果subIでは糖を酸化し、放出された電子が補酵素のFAD、3Fe4S型の鉄硫黄クラスタを経て、シトクロムcであるORF3へと授受されることを解明した。またCYTcを介して電極へ電子移動することを示し埋め込み型酵素電極への応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Glucoside 3- dehydrogenase (G3DH) catalyzes the oxidation of the hydroxy group on the C-3 position of pyranose and shows broad substrate specificity. Due to unique site specificity and wide substrate specificity, G3DHs can be used for detection or synthesis of sugar derivatives. However, few studies have focused on the fundamental biochemical properties of G3DH.

In this study, we isolated the G3DH gene from *Rhizobium radiobacter*, and reported that the genes encoding catalytic subunit (subunit I), hitch-hiker subunit (subunit II), and cytochrome c (CYTc). These proteins were recombinantly expressed in *Escherichia coli* and characterized. Subunit I-II complex showed G3DH activity, EPR and ICP-OES analyses revealed that subunit I contains one 3Fe-4S type iron-sulfur cluster which plays an important role in the electron transfer from FAD to CYTc. We also demonstrated that CYTc mediate the electron transfer from G3DH to electrode without the artificial electron mediator.

研究分野：生物工学

キーワード：グルコシド-3-脱水素酵素 鉄硫黄クラスタ 直接電子移動 シトクロムc ヒッチハイカー シャペロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)G3DH グルコシド-3-脱水素酵素(G3DH)はフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を補酵素とし、グラム陰性細菌の内膜-外膜間のペリプラズムに存在する酵素である。1960年代より *Agrobacterium tumefaciens* (現 *Rhizobium radiobacter*) (K. Hayano & S. Fukui, J. Biol. Chem.1966,242:3665)、*F. saccharophilum*(M. Takeuchi et al., J.Biol. Chem. 1986,100:1049)、また申請者らにより *Halomonas* sp. 15 株や *Cytophaga*

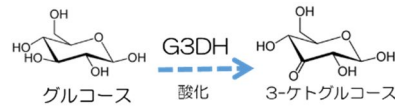


図1 グルコシド-3-脱水素酵素の反応

*marinoflava* (現 *Leeuwenhoekiella marinoflava*)から単離されていた。アルドースの水酸基中、最も酸化されやすいアノマー炭素のC-1位ではなく、C-3位の水酸基を酸化する特異な反応部位特異性(図1)と、様々な糖を基質とする広い基質特異性ことから、我々の研究グループでは *Halomonas* sp. 15 株由来 G3DH を天然の宿主で生産し、血糖コントロールの短期指標である1,5-アンヒドログルシトールの計測、トレハラーゼ阻害剤である3,3'-ジケトトレハロースの合成をはじめその応用について報告してきた。また15株G3DHのクローニング及び大腸菌での組換え発現を行い、その配列が *R. radiobacter* G3DH とホモロジーが高いことを明らかにした。近年は他の研究者もG3DHの応用に注目し、トレハロース酵素燃料電池が報告されている(Pothukuchy A et al., Biosens Bioelectron. 2006,22:678)。

(2) G3DHのサブユニット構成 全ゲノム配列が既知の *R. radiobacter* C58 株ではG3DH遺伝子(図2 ORF1)上流にプロモータ配列、下流に2つのタンパク質(図2 ORF2,3)、ターミネーター配列があることからオペロンを形成していると予想されていた。

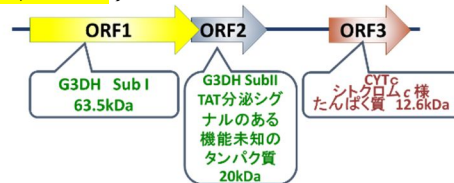


図2 *R. radiobacter* ゲノムのG3DH 遺伝子周辺配列

触媒サブユニットであるORF1は63.5kDaのタンパク質をコードしFAD結合配列と鉄硫黄クラスター様のシステインに富む領域がある。ペリプラズム酵素であるにもかかわらずN末端にペリプラズムへの分泌のためのシグナル配列がない。

ORF2は、20kDaのタンパク質をコードしTAT分泌系のシグナル配列を持つ。5'末端はORF1の3'末端とオーバーラップしている。

ORF3は、シグナル配列を持ち、*R. radiobacter* 由来シトクロムc2と相同性が高くヘム結合領域CXXCHが1ヶ所保存されていることからモノヘムシトクロムcであると予想されていた。G3DHはシトクロムと結合した形では単離されないがシトクロムへの電子授受が報告されているため、サブユニットではなく遊離の状態ではG3DHと電子授受を行うと考えられていた。

(3) *Burkholderia cepacia* 由来 FADGDH 複合体 一方我々の研究グループでは *B. cepacia* から、FADを補酵素とするグルコース脱水素(FADGDH)酵素複合体を単離し、血糖計測用酵素として改良を行っている。

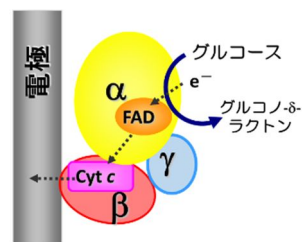


図3 *B. cepacia*由来FADGDH $\alpha\beta$ 複合体

本FADGDH複合体は、68kDaの触媒サブユニット、14kDaでTAT配列を持ちペリプラズムへを輸送するヒッチハイカータンパクであるとともにの発現に必須の、43kDaで3つのc型ヘムを有するシトクロムである電子伝達サブユニットからなる(図3)。このような3つのサブユニットからなる脱水素酵素は

他にも存在し、それぞれのサブユニット同士のホモロジーは高い。本FADGDH複合体の特徴は、シトクロムである電子伝達サブユニットを介して電極へ直接電子を授受する、直接電子移動をする点である。通常、脱水素酵素は電子メディエーターを介して電極へ電子授受するが直接電子移動型酵素は電子メディエーターを添加しなくても基質の酸化により得た電子を電極へ直接伝達できるため、埋め込み型のセンサーや物質生産には理想的である。

G3DH オペロンにコードされているタンパク質とFADGDH複合体は大きさ、配列ともに類似しており、ORF1がコードするSubI、ORF2がコードするSubII、ORF3がコードするCYTcはそれぞれ、機能面でも触媒、ペリプラズムへの酵素の輸送、電子伝達に関与していると予想されていたがそれぞれのタンパク質の機能は解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究課題ではG3DHのSubI,II,CYTcそれぞれの機能を明確にし、産業上有用なG3DHのエンジニアリングの指針を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) *Agrobacterium tumefaciens* (*R. radiobacter*) EHA101株ゲノムよりSubunitI,II,CYTcをコードする連続した領域をPCR増幅し作成したプラスミドをテンプレートとして、G3DHのSubunitI,IIの共発現ベクターpET-His6-G3DH、CYTcの発現ベクターpTrc-CYTc-His6を作成しそれぞれ大腸菌BL21(DE3)に形質転換し組み換え生産、精製した。

(2) SubIの鉄硫黄クラスターの存在及び種類、基質の酸化に伴うFADとの電子授受を確認するためSubI,II複合体のelectron paramagnetic resonance (EPR)計測、inductively coupled

plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES)計測を行った。

(3) CYTcの機能解析のため、CYTcおよびCYTcとSubI,II複合体の共存下で吸収スペクトルを測定し、ヘムに由来する酸化還元ピークの変化を計測した。

(4) CYTc、subI,II複合体を電極に固定化し、基質酸化に伴うCYTcから電極への電子移動を計測した。

(5) SubIIの機能解析のため、SubIのみの発現ベクターの形質転換体、SubI,IIのシステイン点変異導入体を作成し、複合体の活性を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) G3DHのSubunitI,IIの共発現ベクターpET-His6-G3DHは、subIのN末端にHisTagが融合するようにデザインされている。水溶性画分のNiアフィニティークロマトグラフィーで基質-メチルグルコシド(MG)に対する脱水素酵素活性(G3DH活性)のみられた画分をさらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。精製画分のSDSPAGEの結果、65kDa、17kDa付近の2本のバンドが見られたことからsubI,IIは複合体を形成しており精製中も複合体を維持していることが示された。

CYTc生産には*E. coli*由来シトクロム成熟系遺伝子群 $ccmABCDEFGHIH$ を有するプラスミドpEC86と共に形質転換した組み換え体を用いた。精製の結果約12.5kDaに単一のバンドが得られた。

(2) SubI,II複合体はG3DH活性を示した。SubI,II複合体にフェリシアン化カリウムを添加して酸化した場合、EPR計測では315mT(g値2.04)にピークを示した。酵素の基質としてMGを加え還元型にするとこのピークは消失した。subI,II複合体にフェリシアン化カリウムを添加しない場合、315mT(g値2.04)のピークはみられなかった。これらのことからSubIのシステインにとんだ領域は3Fe-4S型の鉄硫黄クラスターを形成し、還元型で生産されること、基質の酸化により生じた電子が、FADから鉄硫黄クラスターに授受される、と考えられた。また鉄硫黄クラスターの鉄は還元状態で生産されることもわかった。

鉄の含量を計測するため、ICP-OES計測に供したところ、SubI,II複合体1モルにつき鉄原子2.5モルが結している結果が得られ、このことからSubIに3Fe-4S型の鉄硫黄クラスター1個が存在していることがわかった。FADGDH複合体におけるサブユニットのアミノ酸配列はSubI配列とホモロジーが高く、またFADおよび3Fe-4S型の鉄硫黄クラスター1個が結合しており基質の酸化により生じた電子が、FADから鉄硫黄クラスターにわたることが解っており両者は類似したサブユニット構造と機能を持つと考えられる。

(3) CYTcのみ、CYTcにMGを加えたもの、CYTcとSubI,II複合体の共存下でそれぞれ可視吸収スペクトルを測定した。酸化型CYTcに特徴的なヘムのソーレ帯に由来する410nmのピークを示した。これに対して、CYTcとSubI,II複合体の共存下で酵素の基質であるMGを加えた場合にはソーレ帯に由来するピークは415nmにシフトし521nmおよび551nmのピークが現れた。これはヘムの還元由来する。これらのことから、CYTcはシトクロムcであり、基質酸化FAD-鉄硫黄クラスター-ヘムcという順に電子授受が行われていることが解った。

FADGDH複合体におけるサブユニットもヘムcを有するがタンパクの分子量、ヘムが3個結合していることなどが異なる。*R. radiobacter* G3DHではシトクロムcはサブユニットとして複合体形成しているのではなく、水溶性のシトクロムc552がありG3DHと電子授受を行うこと、シトクロムc552に対するKmが4.3μMであることが報告されている(H. Hirata, S.

Fukui, Appl. Microbiol. Biotechnol.1968, 47: 780.)そこで本研究でも添加するCYTc濃度を変えてG3DH活性を測定したところ、反応はCYTcに対してミカエリスメンテン型の濃度依存性を示し、Km値は3.4μM、と既報とおよそ一致する値だった。すなわちG3DHでは基質から触媒サブユニットのFAD、鉄硫黄クラスターへと分子内電子伝達し、シトクロムcへ分子間電子伝達されると考えられる。既報では*R. radiobacter*および*F. saccharophilum*でG3DHからの電子は膜結合性のシトクロムcへ分子間電子伝達され、さらに膜結合性シトクロムオキシダーゼがシトクロムcから電子を受けとり呼吸鎖と連結していると報告されており、本研究の場合も天然宿主ではCYTcから呼吸鎖へ電子授受が行われると予想される。

(4) SubI,II複合体とモル比で100倍量のCYTcをカーボンナノ粒子と混合し電極にグルタルアルデヒドで固定化した。400mVvs Ag/AgClを印加し、基質としてMGを添加したところ、濃度に依存した酸化電流が得られ、基質酸化に伴いG3DHからCYTcへ、CYTcから電極への電子移動

が計測された。フェリシアン化カリウムなど低分子量の電子メディエータを介さずに蛋白質から電極への直接電子移動が起こることから、埋め込み型の酵素電極や燃料電池、電解合成、連続計測装置への応用が考えられる。

### (5) SubII の機能

SubunitII なし、SubunitI のみで発現を試みた場合には水溶性画分、不溶性画分とも SubI に相当する 65kDa のたんぱく質のバンドはなかった。SubI にはシグナル配列がなく、II は I と複合体を形成して II の TAT シグナル配列を細胞に認識させ複合体をペリプラズムに輸送させる、ヒッチハイカー蛋白質であると予想されている。TAT システムは、正常にフォールディングした蛋白を輸送するシステムであるため SubI の FAD 結合や鉄硫黄クラスタの形成された成熟体を輸送する。SubI のみで発現させた場合には正しい構造を形成できず細胞内で分解されたものと考えられる。つまり SubI は細胞内で SubII と結合することが必須であって SubII はシャペロン様の機能も示すと考えられる。FADGDH 複合体の組み換え生産においてもサブユニットのみをコードするベクターではサブユニットたんぱく質が発現せず、サブユニットはシャペロン様の機能を持つと報告されていることと一致する (Yamaoka et. al, Biotechnol. Lett. 2004, 26: 1757)。

当初 SubI の立体構造モデリングによる基質結合部位の解析を計画していたが、SubII との相互作用が重要であり、構造既知の FADGDH とは全体のホモロジーは高いが、SubII の配列が部分的に大きく異なることから詳細なモデリングは困難だった。そこで今後の G3DH の結晶構造解析を目指し、精製組み換え SubI, II 複合体の“大量”調製を試みた。精製 SubI, II 複合体の SDS-PAGE における SubII のクマシー染色後のバンド強度は SubI と比して弱い。SubI に融合した Histag によるアフィニティ

上段 SubI of *R. radiobacter* G3DH  
下段  $\alpha$  Subunit of *B. cepacia* sp. SM4 GDH



図4システインリッチ領域のアライメント

クロマトグラフィーで精製する間に SubII が解離し SubI のみの蛋白が混在していると考えられたためバンド強度から解離の割合を求めたところ、精製酵素の 1/3 は I, II が解離していると算出された。FADGDH 複合体は、サブユニットにある Cys152 がサブユニットのシステインリッチな領域中の Cys213 とジスルフィド結合で強固に結合しているため高い熱安定性を示す。G3DH では SubI にシステインリッチな領域が保存されているが、該当する残基は Cys ではなくグルタミンであり、SubII とジスルフィド結合していないことから解離しやすいと考えられた。(図 4,5)

上段 SubII of *R. radiobacter* G3DH  
下段  $\gamma$  Subunit of *B. cepacia* sp. SM4 GDH

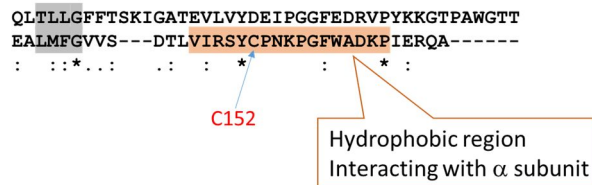


図5 SubII,  $\gamma$ サブユニットC末端付近のアライメント

そこで構造解析のための安定な複合体の獲得と、当初目的の SubI, II 界面のアミノ酸残基を明らかにする目的とから、SubI, II 複合体におけるサブユニットの相互作用部位に注目した。他方、今後の G3DH の産業応用のためにも安定な酵素は必要である。BcGDH サブユニットとサブユニット間のジスルフィド結合に相当する位置に SubI, II にもジスルフィド結合を導入することで安定した複合体形成を目指した。サブユニットと SubI のシステインリッチ領域の一次配列のホモロジーが高い(図 4)ことから、サブユニットの C213 に相当する subI の Q232C 変異体を作成した。サブユニットと subII のホモロジーは低いため 11 か所を選び Cys に置換し、subI の Q232C 変異体と、subII の Cys 変異体を共発現するベクターを作成した。subII の変異箇所は、I-TASSER を用いたモデリングに元ついて候補を決定した。図 6 にサブユニットの立体構造と SubII の予測された構造を示す。サブユニットは C 末端の疎水的な領域がサブユニットと相互作用している。アミノ酸配列のホモロジーは特にこの領域が低いため、変異導入する残基は C 末端近辺のループから 6 か所と、さらに N 末端よりのループから 5 か所を選んだ。水溶性画分を用いて活性測定、SDS-PAGE を行ったところ、subI の Q232C

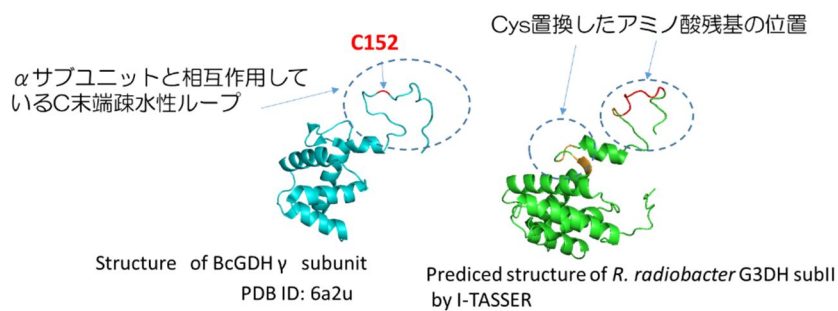


図6  $\gamma$ サブユニットの立体構造、SubIIの立体構造予測

21

変異体/subII wt は subI wt/subI wt とほぼ同等の G3DH 比活性と培養液当たりの活性(生産性)を示し subI の Q232C 変異は酵素活性に影響がないこと、発現量に影響がないことが示された。subII の Cys 変異体を subI Q213C と共発現した場合、SDSPAGE ではすべて SubI のバンドが見られ、ほとんどの置換体に活性があった一方、生産性が高くなったものはなかった。比活性が比較的高かった変異体の熱安定性を評価したが向上したものは見られなかった。SubI の蛋白が発現していることから Cys 変異 subII はシャペロニン様活性が残っていると考えられる。このことから Cys 変異は I-II 間の相互作用には大きく影響しない変異だが subI の 213C と SS 結合できる位置にはなかったと考えられる。

以上、本研究では以下について明らかにした。*R.radiobacter* ゲノム上の G3DH 遺伝子は下流のタンパク質(図 2 ORF1,2,3)とオペロンを形成しており、ORF1 は触媒サブユニットである 63.5kDa の subI をコードし FAD、3Fe4S 型の鉄硫黄クラスターを有する。ORF3 は、モノヘムシトクロム c である CYTc をコードする。基質の酸化で得られる電子は subI の FAD から鉄硫黄クラスターへと分子内で電子伝達され、遊離の CYT c へ分子間電子伝達される。ORF2 は、subII をコードし TAT 分泌系のシグナル配列を持ち細胞内で subI と結合しその成熟に必須で、ペリプラズムへ subI,II 複合体を輸送する。SubI,II 複合体は精製中に解離しやすいため安定な複合体を得る目的で Cys 変異を subI,II に導入したが安定性の向上した変異体は得られなかった。subI, II 複合体と CYTc を電極に固定化し基質酸化に伴い CYTc へ、CYTc から電極への電子移動が計測できた。蛋白質から電極への直接電子移動が起こることから、埋め込み型の酵素電極や燃料電池、電解合成、連続計測装置への応用が期待される。

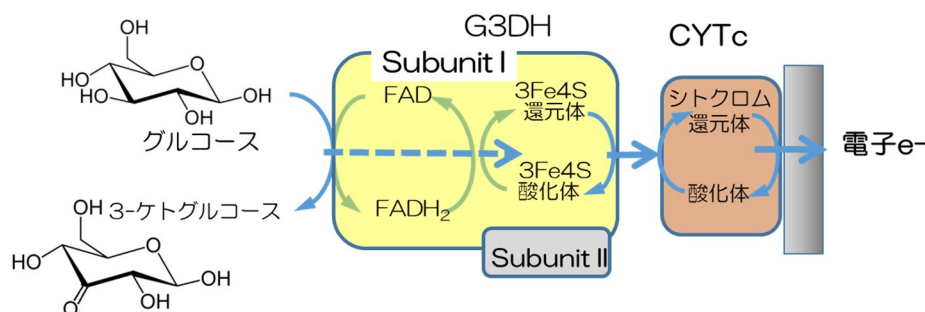


図7 *R.radiobacter* G3DHの反応模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryota Miyazaki ,Tomohiko Yamazaki ,Keiichi Yoshimatsu , Katsuhiko Kojima , Ryutaro Asano Koji Sode , Wakako Tsugawa	4. 巻 122
2. 論文標題 Elucidation of the intra- and inter-molecular electron transfer pathways of glucoside 3-dehydrogenase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bioelechem.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 謝 理恵 , 宮崎 諒太 , 平賀 健太郎 , 早出 広司 , 津川 若子
2. 発表標題 グルコシド 3-脱水素酵素サブユニット スワッピング が酵素活性に与える影響
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会ポスター発表
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津川若子
2. 発表標題 Elucidation of the intra- and inter-molecular electron transfer pathways of glucoside 3-dehydrogenase from Rhizobium radiobacter
3. 学会等名 The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiko Yamazaki, Ryutaro Asano, Katsuhiko Kojima, Ryota Miyazaki, Koji Sode, Wakako Tsugawa
2. 発表標題 Electrochemical Properties of Glucoside 3-Dehydrogenase, an Enzyme for 1,5-Anhydro-D-Glucitol Sensing
3. 学会等名 XXIV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳瀬 琢望、小嶋 勝博、津川 若子、浅野 竜太郎、早出 広司
2. 発表標題 FAD依存型グルコース脱水素酵素に対する電子受容体タンパク質の検討
3. 学会等名 電気化学会第85回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考