

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570110

研究課題名（和文） 膜結合型キノプロテイン脱水素酵素の構造と機能

研究課題名（英文） Structure and function of membrane-bound quinohemoprotein  
Alcohol dehydrogenase

研究代表者

宮原 郁子 (MIYAHARA IKUKO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40271176

研究成果の概要：酢酸菌由来の膜結合型キノプロテイン・アルコール脱水素酵素の3次元構造をX線構造解析法により決定した。膜結合部位サブユニット表面には2つの大きな窪みがあり、ユビキノンの還元部位とユビキノールの酸化部位と考えられた。分子内で電子伝達に関与している補因子 PQQ と4つのヘムの結合箇所を決定し、それぞれの相対分子間距離との酸化還元電位の値から、酵素中の分子内電子移動ルートを合理的に説明することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

研究分野：構造生物化学・X線構造解析

科研費の分科・細目：

キーワード：X線構造解析・キノプロテイン・アルコール脱水素酵素

## 1. 研究開始当初の背景

NAD, FADに次ぐ第3の補酵素として、メタノール資化性細菌のメタノール脱水素酵素からピロロキノリンキノン(PQQ)が発見されて以来これまでに、4種類のビルトイン型補酵素（翻訳後修飾を受けて出来たキノン型補酵素）が同定されてきた。これらキノン型補酵素は、新規性、生合成、化学構造、化学反応性などの点から注目された。また、これらの補酵素を持つ酵素はキノプロテインとよばれ、酸化還元反応とそれに続く電子移動の機構を中心にして、これまでに膨大な構造と機能の研究がなされてきた。

1998年に足立、松下等が、新規のキノヘモ

プロテインアミン脱水素酵素(QH-AmDH)を見出し (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 469-478)、この酵素がトリプトファントリプトフィルキノン(TTQ)に類似の新規補酵素を持つ可能性を示唆した。我々は *Psuedomonas putida* 由来のQH-AmDHの立体構造を明らかにし、新規補酵素システイントリプトフィルキノン(CTQ)とCTQを囲む異常なS-C分子内架橋をもつことを見出した (A. Satoh, J. Kim, I. Miyahara, 他8名, K. Tanizawa, K. Hirotsu. *J. Biol. Chem.*, 277(4), 2830-2834 (2002). Epub 2001 Nov 9.)。同時に米国ではF.S. Mathewsのグループが *Paracoccus denitrificans* 由来のQH-AmDHの構造解析に構造決定に成

功し、同様な構造を発表した(S. Datta, 他 8 名, K. Tanizawa, F. S. Mathews. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**(25), 14268-14273, (2001) Epub 2001 Nov 20.)。

キノプロテイン脱水素酵素には可溶性のものとペリプラズム側から細胞質膜に結合するものがある。前者は電子伝達蛋白を介して細胞質膜の呼吸鎖に電子を渡すのに対し、後者は直接呼吸鎖と連結している。これまでに可溶性のキノプロテインについては、相当数の構造が決定されているが、膜結合型キノプロテインは、これまでに数多くの生化学的、分光学的研究の蓄積があるにもかかわらず、X線解析の例はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では以下に挙げる 3 つの膜結合型脱水素酵素の高次構造を決定し、生化学的、分光学的研究の結果と総合して、原子レベルでの構造・機能解析を行う。

### アルコール脱水素酵素 (ADH)

酢酸菌には細胞膜表層、ペリプラズム側に結合するアルコール脱水素酵素(ADH)があり、酢酸発酵で中心的な役割を担っている。ADH は、エタノール 酸化系の初発酵素であり、エタノールのアルデヒドへの酸化を膜結合呼吸鎖とリンクしておこなっている。ADHは 3つのサブユニットからなる複合体である。キノヘモプロテイン・サブユニットは、補酵素PQQと補欠分子族へムc (*cl*) を結合している。シトクロム・サブユニットは3分子のへムc (*chl1*, *chl2*, *chl3*)を結合し、さらに電子メディエータとして働くユビキノン(UQ)の高親和性結合部位、バルクのUQとユビキノール(UQH<sub>2</sub>)の低親和性結合部位がある。ADHには“活性型”酵素に加えて“不活性型”酵素が

存在し、酸化還元状態に依存して相互に変換する。この変換は呼吸鎖との連結に密接に関係している。“活性型”はバルクのUQを介して末端オキシダーゼにリンクするエタノール酸化系呼吸鎖を形成しているのに対し、グルコースや糖アルコールを酸化している培養条件下ではUQへの電子伝達能が減少し逆にユビキノール (UQH<sub>2</sub>) の酸化能が増加した“不活性型”ADHに転換することが分かっている。

### グリセロール脱水素酵素(GLDH)

酢酸菌の細胞膜には、キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素(GLDH)が存在し(図 1)、グリセロールだけでなく、様々な広範の糖アルコールやいくつかの 2 級アルコールなどをも酸化している。

### グルコース脱水素酵素(GDH)

大腸菌には膜結合型のグルコース脱水素酵素(GDH)がある(図 1)。GDH はグルコースの D-グルコン酸への酸化を呼吸鎖とカップルして行っており、酢酸菌 ADH と同様に、バルクのUQ を介して電子をシトクロム *bo* オキシダーゼに渡して、呼吸鎖を完成する。

ADH の立体構造より、PQQ、4つのへム *c*、UQ の位置関係を調べ、電子移動の経路の詳細を解明する。一方、GLDH と GDH は ADH と比べ単純な電子伝達系を持っている。へム *c* を分子内に結合せず、電子伝達蛋白の介在もなしに、バルクのUQ を還元する。GDH の高次構造に基づいて、補酵素 PQQ から電子メディエータ UQ を経てバルクのUQ へと至る基本的な電子移動機構を解明する。GLDH も同様であるが、膜貫通領域がキノプロテイン部

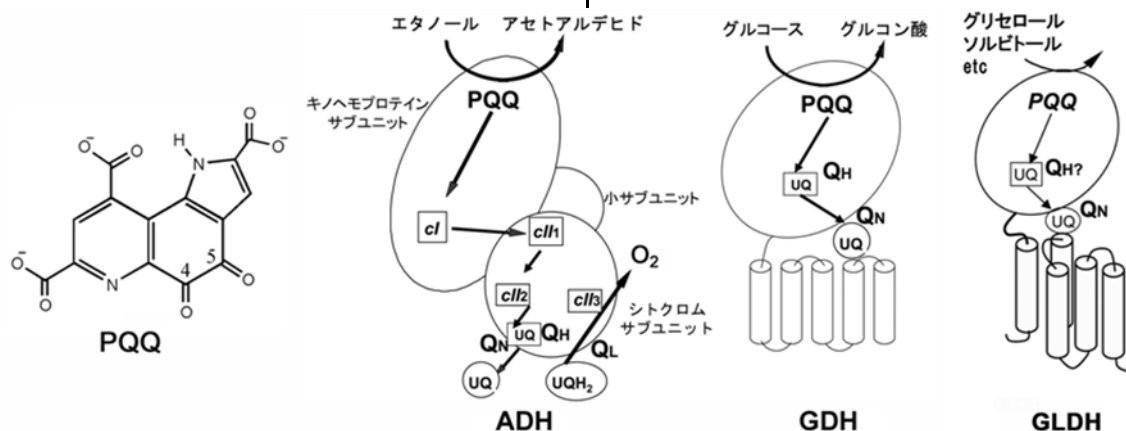


図1 補酵素PQQの化学構造、ADH、GDHとGLDHとの電子移動の概略図。  
QH:UQの高親和性結合部位、QN, QL:それぞれバルクUQとUQH<sub>2</sub>の低親和性結合部位。

位と繋がっている GDH と異なり、その領域がサブユニットとして独立しているため、電子移動においても何らかの違いが期待される。加えて、3 者はその膜との相互作用においても、膜貫通領域をもつ GLDH と GDH に比べ、それをもたず膜表面に両親媒性ヘリックスで吸着していると予想されている ADH では大きな違いが予想される。

直接呼吸鎖とリンクする ADH の高次構造と生化学的・物理化学的研究とを総合することによって、ペリプラズム酸化系の電子伝達機構の解明を一挙に進めることができると考える。また、典型的な膜貫通領域をもつ GDH と GLDH は、他の脱水素酵素に比べ、単純な電子伝達系を持ち、電子伝達に必要な最小限の機構を持っているはずである。しかし、その膜貫通領域が共有結合している GDH と独立している GLDH とで高次構造に基づく電子伝達機構およびその制御機構の違いが期待される。

### 3. 研究の方法

#### ADHの精製・結晶化・構造解析

“活性型” ADH および “不活性型” ADH の精製法は確立されているのでこれらを精製し、X線結晶構造解析に適した結晶を得るための条件を検索する。温度、pH、バッファー、界面活性剤、沈殿剤などの結晶化条件を最適化し、さらに結晶核生成のためのレーザー照射、温度アニリング法を用いて、放射光施設において2.5Å分解能の結晶の作成を目指す。重原子誘導体のデータを収集し、モデル構築を行う。また、ADH複合体蛋白は、キノヘモプロテイン・サブユニットと小サブユニット複合体とシトクロム・サブユニットとに分離でき、それぞれを安定に精製することができる。前者は可溶性蛋白であり後者は膜結合蛋白である。ADH複合体そのものよりも、結晶化が容易で高分解能の結晶が得られる可能性がある。重原子同型置換法あるいは分子置換法により構造決定を行う。得られた構造を、ADH複合体の低分解能(3.1~3.5Å)の構造に埋め込み、より詳細な立体構造を知ることが可能である。

#### GLDHの結晶化・構造解析

精製法は確立されており、培養、酵素精製はルーチン作業で行う事ができる。精製した酵素を用いて結晶化の条件検索をおこなう。結晶が得られた場合、大阪市大の in-house の装置、もしくは放射光施設を利用して回折実験をおこなう。同型置換法、分子置換法を併

用し、構造決定をおこなう。

#### GDHの精製・結晶化・構造解析

精製法は確立されており、培養、酵素精製はルーチン作業で行う事ができる。精製した酵素を用いて結晶化の条件検索をおこなう。結晶が得られた場合、大阪市大の in-house の装置、もしくは放射光施設を利用して回折実験をおこなう。GDHは既に可溶性キノプロテインの構造が解析されているので、分子置換による構造決定を試みる。

#### ADH, GDH および GLDH の PQQ 結合様式・膜結合様式の比較

この3つのキノプロテインはその PQQ との結合において、特徴的な違いを有している。ADH は  $\text{Ca}^{2+}$  を介して PQQ と非常に強固に結合しているのに対し、GDH および GLDH はその結合が強固でなく比較的簡単にアポ化する。また、両者は GDH が  $\text{Mg}^{2+}$  を介して結合しているのに対し、GLDH はその結合に  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  を必要とすることで大きく異なっている。3者の酵素の PQQ の結合様式の精密構造解析を行う。この解析は、キノプロテインの構造・機能に非常に大きな情報を与えると期待される。

### 4. 研究成果

#### アルコール脱水素酵素 (ADH) について

結晶化条件を最適化した結果、図2のような赤色の結晶を得ることができた。格子定数は  $a = b = 241.7$ ,  $c = 308.9$  Å 空間群は I422 で分解能は 3.2Åであった。

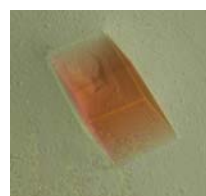


図2

ADHの立体構造は金と白金を用いたMIR法により構造決定をおこなった。

Subunit A (78kDa) は、PQQ (red) と cytochrome (purple) の2つのドメインが長いリンカーで繋がっている。N末端側のPQQドメインは8枚羽の b-propeller 構造で、他の PQQ 依存型酵素のキノプロテインやキノヘモプロテインにも非常によく似た構造が見られる。C末端側の cytochrome ドメインは3つの  $\alpha$ -ヘリックスからなる。

Subunit B(48kDa) は膜結合部位と考えられるが、3つの cytochrome ドメインからなる。N-末端 (orange) ドメインは3つの  $\alpha$ -ヘリックスと2つのストランドからなる逆平行  $\beta$  シートを1つの  $\alpha$ -ヘリックスがつかないでいる。N末端と中央のドメイン (yellow) の

間に大きくくぼみがある。C-末端(green)ドメインはSubunit AとBの間に位置する。静電ポテンシャルマップによるとSubunit Bの下方に疎水的な表面があるとされている。極性な芳香族残基であるTrpやTyrなどが脂質のカルボニルと特異的な相互作用をするべく、疎水面のへりに存在していて、Subunit Bは膜結合部位を含むと考えられる。Subunit C(14kDa)は4つの $\alpha$ ヘリックスバンドルと短い2つの逆平行 $\beta$ シートからなり、Subunit AのPQQドメインと相互作用しているが、役割は明らかになっていない。

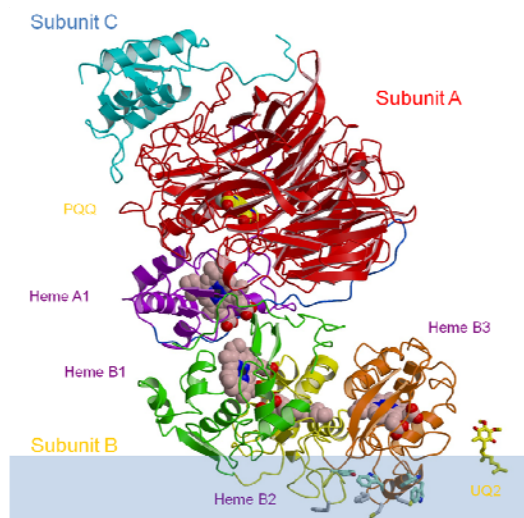


図3. ADHの全体構造

ADHのレドックス補因子であるPQQは、カルシウムイオンに配位していた。このPQQ-Ca+部分はCys141、Cys142のジスルフィド結合とTrp279のインドール環に挟まれている。PQQは主として水溶性のキノヘモプロテインADH群の間で保存されているアミノ酸残基の側鎖との水素結合により固定されている。ただし、Asp197、Asn431、Phe432を除く。

図4. PQQの結合様式

4つヘムは全て2つのCys残基と1つのHis残基、Met残基が配位している。PQQのC5原子とheme-Aに結合するCys656<sup>A</sup>のS原子の距離が14 Åである。また、4つのヘムの最短距離はそれぞれおよそ9 Å、4 Å、8 Åであった。

UQの結合した構造は得られていないが、サブユニットBに存在する窪みより予測された。5つの補因子の距離とUQの結合部位を仮定すると、ADHはエタノールからPQQが引き抜いた電子を、heme c (heme A1)と2つのhemes c (heme B1とB2)を経由してユビキノンを伝達することが説明でき、これはそれぞれの酸化還元電位の値とうまく一致することがわかった。

## グリセロール脱水素酵素(GLDH)について

GLDHについては、高発現する菌株を用いることにより、1回の精製で20mg近い試料が得られるようになったが、凍結融解には弱く、現在保存条件を検討している。また、昨年度に界面活性剤としてTween-20というを用いて精製すると膜貫通サブユニットが外れたものが得られるという報告があり、現在はそれを用いて結晶化の検索を行っているところであり、現在のところはまだX線構造解析に適した結晶が得られていない状況である。

## グルコース脱水素酵素(GDH)について

GDHについては、ユビキノ高結合型の変異体によって得られる試料を用いて結晶化を試みている。現在のところ再現性良く球晶を得ることができているので、それをX線結晶構造解析が可能な結晶になるよう条件検討をしている。いずれにしても1度の精製で得られる試料が現在のところ非常に少ないため、精製条件、菌株についても検討中である。

## 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)

[学会発表] (計 4件)

後藤勝、広津建、外山博英、足立収生、松下一信、宮原郁子、酢酸菌由来膜結合型アルコール脱水素酵素の結晶構造解析、第26回PFシンポジウム、平成21年3月25日、つくば国際会議場

後藤勝、Analysis of structure and function of membrane-bound alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria、The 2nd International Conference on Acetic Acid Bacteria、平成20年11月11-14日、名古屋大学野依記念館

後藤勝、広津建、小林由宜、中柄朋子、外山博英、足立収生、松下一信、宮原郁子、X-ray Structure of membrane-bound quinoxinohemoprotein alcohol dehydrogenase、The Second International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors、平成20年10月26-31日、University of Georgia, USA

後藤勝、広津建、小林由宜、中柄朋子、外山博英、足立収生、松下一信、宮原郁子、Structure of membrane-bound quino hemoprotein alcohol dehydrogenase, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 平成20年8月23-31日, 大阪国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮原 郁子 (MIYAHARA IKUKO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40271176

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

後藤 勝 (GOTO MASARU)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：80379289