

平成22年 5月 17日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19790035
 研究課題名 (和文) 3 ヒドロキシステロイド脱水素酵素の構造学的研究

研究課題名 (英文) Structural study on 3 -hydroxysteroid dehydrogenases

研究代表者 中村 昇太 (NAKAMURA SHOTA)
 大阪大学・微生物病研究所・特任助教
 研究者番号：90432434

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、以前我々が結晶構造を決定した *Pseudomonas* sp. B-0831 株由来 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase(Ps3 α HSD)の基質結合ループの運動性と反応機構との関係を明らかにするために、100 nsec の分子動力学計算を行った。シミュレーション中において、NADH が結合しているホロ型のサブユニットの構造には変化がなかったが、アポ型においては基質結合ループが大きく開く運動を観測した。これらの観測結果から、変異実験を行い、188 番の Thr を Ala に変異させた変異体は NADH 結合における、ヘリックスの誘起性と負の協同性が失われていることを見出した。これらの結果によって、基質結合ループの構造変化が Ps3 α HSD に NADH 結合における負の協同性の特徴をもたらしていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we performed a 100-ns molecular dynamics simulation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. B-0831 (Ps3 α HSD) to elucidate the flexibility and mobility of the substrate-binding loop. During the simulation, the structure of the holo-subunit was kept unchanged because of NADH interaction with the substrate-binding loop. On the other hand, the substrate-binding loop in the apo-subunit opened and fluctuated largely. By careful observation of the simulation, we designed the next mutagenesis study and found that T188A mutant lost the ability of loop-helix transition and negative cooperativity for NADH binding. These results suggest that high mobility of the substrate-binding loop could produce Ps3 α HSD with characteristic activities such as negative cooperativity for NADH binding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物分子構造学

1. 研究開始当初の背景

ステロイドは生物で広く使われる情報伝達物質であり、それらに共通するステロイド骨格の一部の改変によって、様々な生理活性を示す。これらのステロイド化合物を生合成するために、生物は多様な酵素を保有しており、その活性を制御している。ヒドロキシステロイド脱水素酵素はステロイド骨格の水酸基-ケトン基間の相互変換を触媒する酵素で、ステロイド生合成にとって重要な役割を担う酵素である。多くのヒドロキシステロイド脱水素酵素は、共通するロスマンフォールドと呼ばれる補酵素結合モチーフ構造を形成する。このような同様の三次構造を保持しているにも関わらず、脱水素酵素はステロイド骨格の酸化還元反応に対して厳密な位置選択性を有しており、その選択性に基づいて名付けられている。例えば、3 位の水酸基-ケトン基間の触媒する酵素は 3 ヒドロキシステロイド脱水素酵素と呼ばれており、他にも 3、7、11、17、20 など、多種多様な酵素が存在する。これらの酵素がどのようにして厳密な位置選択性や立体選択性を生み出しているのかは、長い間議論的になってきた。

我々は細菌 *Pseudomonas* sp. B-0831 株由来 3 ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (Ps3 α HSD) を用いて酸化還元反応の機構解明に取り組んできた。細菌由来の 3 ヒドロキシステロイド脱水素酵素は 26 kDa でホモ 2 量体を形成している。この酵素はステロイド骨格だけでなくベンズアルデヒドのような単純な化学構造のアルデヒドも酸化還元することができ、細菌の一連の生体防御機構において生体外異物代謝の初期段階に関わっていることが知られている。我々はこの酵素の NADH 結合型の立体構造を決定し、NADH 結合が誘起する構造変化を捉えた。NADH はホモ 2 量体の一方の単量体だけに結合しており、それに伴ってループから 2 本のヘリックスへの構造変化が起きていることが明らかになった。従来、この構造変化が起こった領域は、基質結合によって構造変化が起こり位置選択性や立体選択性の制御を行うと考えられていた「基質結合ループ」であった。この基質結合ループが補酵素である NADH の結合だけによって 2 本のヘリックスへと構造変化し、基質結合のためのポケットを形成することを明らかにした。また、このヘリックスの形成能を補酵素の NAD

と NADH で比較したところ、NADH の方が NAD よりも形成能が高いことが判明した。さらに、このホモ 2 量体中の方で起こる構造変化が、もう一方の単量体に伝わって補酵素結合能を減少させる負の協同性があることを見出した。

このように、NADH が誘起する構造変化から負の協同性が見られる稀有な例を見出したが、どのようにして NADH が構造変化を引き起こすのか、負の協同性に至る過程などを明らかにするために、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究においては、分子動力学計算によるシミュレーションによって、ホモ 2 量体への 1 分子の NADH 結合がどのような構造変化を引き起こすのかを明らかにする。またこのシミュレーションで構造変化に重要な役割を果たすアミノ酸を同定する。さらにシミュレーションで得られた結果を実験的に証明するため変異体作成を行い、それらの円二色性 (CD) スペクトルの補酵素濃度依存性を測定することにより構造変化を調べる。これらの実験によって、Ps3 α HSD の反応機構を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 分子動力学計算

Ps3 α HSD の分子動力学計算はプログラム MARBLE (横浜市大・池口満徳博士開発) を用いて行った。蛋白質用の分子力場は CHARMM27、水は TIP3P モデルを用いた。初期構造としては、NADH との複合体結晶構造 (PDB code: 2DKN) を使用し、アポ型サブユニットの基質結合ループ部分のディスオーダー領域はホロ型サブユニットの基質結合ループを参照してモデリングを行った。計算する系には蛋白質中の 31,744 原子、補酵素 NADH の 71 原子、12,126 原子の水と 12 原子のカウンターイオンが含まれる。定温定圧の 300K の条件下で、刻み幅 2.0 fsec 毎のシミュレーションを行った。まず 2.0 psec のエネルギー最小化を行い、0.1 nsec の蛋白質および補酵素原子の拘束付きの平衡化の後、拘束を徐々に解く平衡化を 0.1 nsec 行った。これら平衡化処理の後、100 nsec の計算を行った。計算後の解析には主に VMD を使い、二次構造アサイメントは DSSP で行った。

(2) 変異体の調製

Ps3 α HSD の DNA フラグメントを pET28a にクローニングし、このベクターを導入した大腸菌 BL21 (DE3) を 37°C で培養し IPTG による大量発現誘導を行った。大量発現した蛋白質は、ニッケルアフィニティーカラムによって精製した。

(3) 活性測定

活性測定は 37°C で 40 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.025% nitro tetrazolium blue, 0.4% TritonX100, 2.5 U/ml diaphorase, 1.0 mM NAD⁺ の条件で、20 mM cholic acid の添加により反応を開始し、0.5% SDS の添加で反応を止めた。

(4) CD 測定

CD 測定は 10 mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM NaCl の 90 μ M 蛋白質溶液で、0.1 mm セルを用いて円二色性分散計 JASCO J-720 により測定を行った。

4. 研究成果

(1) Ps3 α HSD のダイナミクス

エネルギー最小化及び、2 段階の平衡化計算後の構造を図 1 に示す。初期構造に用いた結晶構造にはホモ 2 量体の Ps3 α HSD に対して 1 分子の NADH が結合しており、ホモ型サブユニットとアポ型サブユニットが会合した構造学的なヘテロ二量体を形成している。平衡化後の構造に初期構造からの大きな変化は観測されなかった。

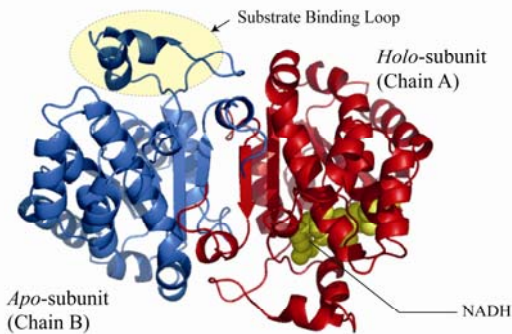


図 1. 平衡化後の Ps3 α HSD 構造

100 nsec のシミュレーションの初期構造からの根平均二乗変位(Root Mean Square Deviation, RMSD)と根平均二乗ゆらぎ(Root Mean Square Fluctuation, RMSF)をホロ型サブユニットとアポ型サブユニットに分けたプロットを図 2 に示す。約 43 nsec 付近において、アポ型サブユニットのみに大きな構造変化が観測された(図 2a)。またこの構造変化が起きた部分は残基番号 180-200 番の基質結合ループ領域だけであった (図 2b)。

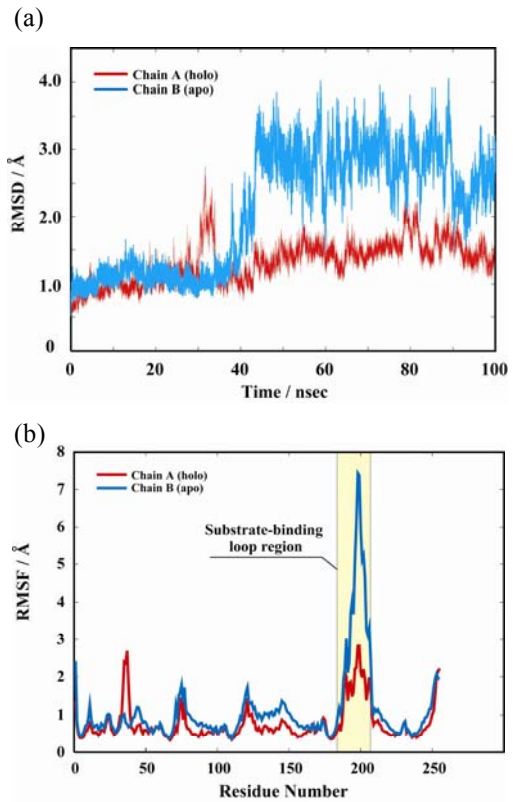


図 2. (a)100 nsec シミュレーションの初期構造からの RMSD (b)RMSF プロット横軸は残基番号。

この構造変化を見るために 10 nsec 毎の重ね合わせ構造を図 3 に示す。ホロ型サブユニットでは NADH と基質結合ループの相互作用によって、構造が維持され全体的なゆらぎが小さいが、アポ型サブユニットにおいては、基質結合ループが大きく揺らぎ、溶媒側に大きく開くような運動が起きていることが明らかになった。

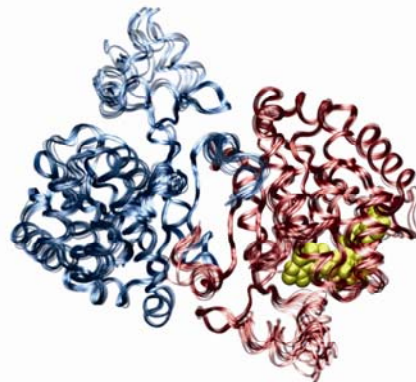


図 3. 10 nsec 毎の 10 個の重ね合わせ構造

次に 100 nsec 中の基質結合ループのヘリシティを DSSP により調べた。その結果を図 4 に示す。

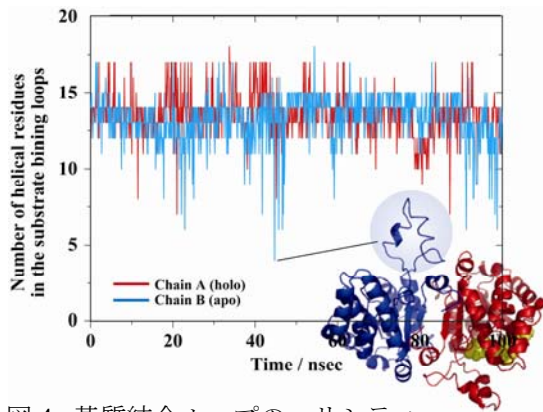


図4. 基質結合ループのヘリシティ

ホロ型サブユニットの基質結合ループに比べ、アポ型サブユニットの基質結合ループのヘリシティは大きく揺らいでおり、ヘリックスが緩んでいる構造が観測された。この結果はNADH結合によって、ヘリシティが増加するという我々が以前見出した事実と一致する。この100 nsecのMDシミュレーションによって、NADH結合型のホロ型サブユニットはNADHとの相互作用で基質結合ループ領域のヘリックスが維持されるが、アポ型サブユニットにおいては、ループがゆるみ、57°の開閉運動が起こることが明らかになった。

(2) 部位特異的変異によるPs3αHSDの解析

Ps3αHSD中のどの残基が基質結合ループのヘリックス形成や開閉運動に重要な役割を果たしているのか、部位特異的変位導入によって調べた。候補残基は100 nsecのシミュレーション中に基質結合ループやNADH分子と相互作用していたアミノ酸4種T75, T188, L190, Y200を選択し、それぞれAlaに置換した変異体の調製を行った。野生型と同様に大量発現・精製した変異体について、まず酵素活性測定を行った。その結果、野生型に比べ、T188A変異体に著しい活性低下が見られた(図5)。

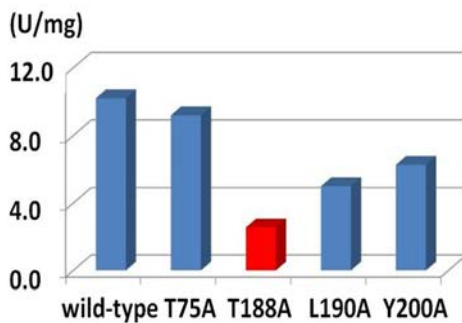


図5. 野生型および変異体の酵素活性

次に、この活性が低下した変異体T188AのNADH結合によるヘリックス形成誘導能をCD測定によって調べた。その結果、野生型ではNADH濃度依存的にヘリックス含量が増加していくスペクトルが得られたが、T188AではNADHを添加したものとしていないものに差があまりなく、NADH結合によるヘリックス形成が見られないことが明らかになった(図6)。

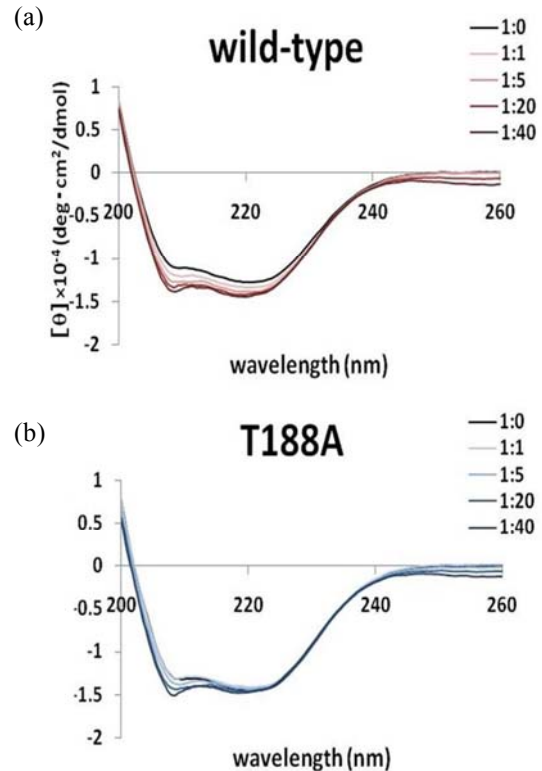


図6. NADHを添加したCDスペクトル、(a) 野生型、(b) T188A 変異体

このT188A変異体について、さらに補酵素結合の負の協同性について調べた。野生型ではNADH結合のみに協同性の指標となるhill定数が0.722となり、負の協同性を示したのに対し、T188A変異体ではhill定数が0.933とほぼ1となり、負の協同性が失われていることが示された。

(3) 考察

Ps3αHSDの100 nsecの分子動力学計算によって、アポ型サブユニット中の基質結合ループの特徴的な開閉運動を見出した。この開閉運動はNADHとの結合状態にあるホロ型サブユニットでは起こらず、アポ型サブユニットのみに約43 nsecから観測された。100 nsecでは完全にループ構造となった基質結合ループは観測されなかったが、ヘリックス構造が緩んだ構造が見られた。NADH非結合状態において、Ps3αHSDの基質結合ループは常に

緩んだループ構造で開閉運動を数十から数百 nsec 毎に繰り返している可能性が示唆された。このような開閉運動とともに、ヘリックスが緩んでいく数十 nsec の構造変化を MD 計算で示した例は稀有であり、部分的なアンフォールドが反応機構に含まれる非常に興味深い結果であると考えられる。

またこのシミュレーション結果から、このヘリックスループ変化に重要な役割を示すアミノ酸の候補部位を選択し、特異的変異導入によって酵素活性が低下した T188A を見出した。この T188A 変異体は NADH 添加によるヘリシティの増加を示さず、また NADH 結合の負の協同性を示さなかった。Thr188 は基質結合ループの根元部分に位置するアミノ酸であり、NADH と基質結合ループの両方に相互作用している。まず、この Thr188 が NADH 結合によって固定され、さらにこの Thr188 の側鎖の水酸基が基質結合ループの 1 本目のヘリックスの N 末端のアミノ酸主鎖と相互作用することによって、ループが固定され、ヘリックスの形成誘導が起こるのではないかと考えている。この T188A は NADH 結合の負の協同性という性質も失っていた。これは T188A の 1 アミノ酸変異の影響で、ホモ二量体である Ps3 α HSD に 1 分子目の NADH 結合による構造変化が起きなければ、2 分子目の NADH 結合が弱まる性質が失われたことを示している。これは 2 量体間の情報伝達にループヘリックスの構造変化が必須であり、Thr188 と NADH との相互作用がそのトリガーになっていることを示している。

本研究により、Ps3 α HSD の反応機構において基質結合ループの開閉運動とともに部分的なアンフォールドが活性に非常に重要であり、またその構造変化は Thr188 がセンサーとなって引き起こされていることが明らかになった。しかしこれは、この酸化還元酵素の還元方向からの視点であり、酸化反応では構造変化がどうなるのか、また基質の反応性や選択性に与える影響を明らかにすることが、今後の課題である。

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 2 件)

①日本生物物理学会(博多)

2008 年 12 月 4 日

3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase の補因子結合に伴う構造変化の構造および生化学的解析

Yuichiro Takagi, Shota Nakamura, Maiko Koga, Shigeru Ueda, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Masayuki Oda

②日本生物物理学会 (横浜)

2007 年 12 月 21 日

Molecular dynamics simulation of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase with NADH: Structural changes in the substrate-binding loop.

Shota Nakamura, Tomotaka Oroguchi, Tsutomu Yamane, Mitsunori Ikeguchi, Sachiyo Kataoka, Maiko Koga, Masayuki Oda, Yuji Kobayashi and Tadayasu Ohkubo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 昇太 (NAKAMURA SHOTA)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：90432434

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：