

機関番号：17201
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780099
 研究課題名（和文）超好熱アーキアの L-プロリン脱水素酵素複合体の機能構造解析と電子伝達機構の解明
 研究課題名（英文）Functional and structural analyses of the archaeal L-proline dehydrogenase complexes
 研究代表者
 川上 竜巳（KAWAKAMI RYUSHI）
 佐賀大学・総合分析実験センター・助教
 研究者番号：90380120

研究成果の概要（和文）：本研究は、超好熱アーキアの $\alpha_4\beta_4$ 型及び $\alpha\beta\gamma\delta$ 型の L-プロリン脱水素酵素複合体（ProDH）の機能と構造の解明を目的としている。 $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDH については、高分解能かつ鉄イオウクラスターが壊れていない構造の決定や変異酵素（C381S）による S-S 結合の構造形成への寄与を解析した。 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型 ProDH については様々な変異体を構築し酵素の結晶化を試みた。また、ProDH 活性の本体である両タイプの β サブユニットについて、その酵素化学的性質を解析した。

研究成果の概要（英文）：Two different types of ProDHs ($\alpha_4\beta_4$ and $\alpha\beta\gamma\delta$ type) were distributed in the hyperthermophilic archaea. Functional and structural characteristics of both ProDHs were studied. Structure determination at high resolution of $\alpha_4\beta_4$ -type ProDH which the ICS was not broken, and mutational analysis of intersubunit disulfide bond in α subunit of $\alpha_4\beta_4$ -type ProDH were performed. Screening of crystallization condition of $\alpha\beta\gamma\delta$ type ProDH was also performed by preparing the ISC mutant enzymes. And the enzymatic properties of β subunits of both types of ProDHs were analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素化学、構造生物学

1. 研究開始当初の背景

L-プロリン脱水素酵素 (ProDH、EC 1.5.99.8) は FAD 依存的に L-プロリンから Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) への脱水素反応を触媒する酵素である。この反応を触媒する酵素はこれまで、大腸菌やサルモネラ菌などに存在する PutA がよく研究されている。この酵素は ProDH 活性と、P5C から L-グルタミン酸への NAD 依存的な脱水素反応を触媒する P5C 脱水素酵素の 2 つの酵素活性を有するバイファンクショナルな酵素である。また他にも、ヒトなどの真核生物や一部の細菌には ProDH 活性のみを有するモノファンクショナルな酵素も存在する。これらの酵素は構造解析も行われ、ProDH ドメインは ($\beta\alpha$) バレル構造を形成していることが知られている。一方で研究代表者はこれまでに、網羅的活性スクリーニングにより、超好熱アーキアにも ProDH が 2 種類存在することを発見している。この 2 種類は $\alpha_4\beta_4$ 型の複合体構造と $\alpha\beta\gamma\delta$ 型の複合体構造を形成しており、既知の ProDH とは全く異なる。さらに、 $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDH の立体構造を明らかにし、ProDH 触媒サブユニットである β サブユニットの構造は典型的なロスマンフォールドを形成していることを明らかにし、PutA などのバレル構造と全く異なるものであることを明らかにしている。さらにこの構造解析から、この酵素が α サブユニットと複合体を形成することで、フェレドキシン (Fd) などの電子伝達タンパク質を電子受容体にできる可能性があることを示した。一方で、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型 ProDH は、ProDH 成分 (β サブユニット、 $\alpha_4\beta_4$ 型の β サブユニットと高い相同性を有する) と NADH 脱水素酵素成分 (α サブユニット)、2 種の電子伝達タンパク質成分 (γ 、 δ サブユニット) からなり、生体内では L-プロリンから NADH を生産することが示唆されている。これらのことは、この 2 種類の ProDH が、一般に考えられている超好熱アーキアのエネルギー生産経路 (中央糖代謝産物を利用した酸化還元酵素による還元型フェレドキシンの生成によるエネルギー生産) とは別の経路で、エネルギー生産に関与していることを示唆している。これらの酵素の機能・構造に関する研究は、生体内での生理機能解明のために重要であるばかりでなく、この全く新規な ProDH 複合体がどのような構造で、どのような電子伝達を行い、どのような電子受容体に電子を渡すのか、という電子伝達機構の解明にも役立つ点で興味深い。一方で、本酵素は人工色素 (メディアータ) も電子受容体にできること、既知の酵素に比べ格段に安定性が高いことなどから、このタイプの酵素では初めて電極への固定化に成功し、バイオセンサーやバイオ電池の素子として利用できることを明らか

にしており、応用開発を進める上で重要な情報を得るためにも、その機能・構造に関する研究は急務となっている。

2. 研究の目的

真正細菌には多種多様な呼吸鎖酵素が存在し、様々な有機物を利用して ATP を生産することができる。*Thermococcus* や *Pyrococcus* 属の超好熱アーキアでは、解糖系に存在するフェレドキシン依存性のオキシドレダクターゼとヒドロゲナーゼ・ATPase の共役による ATP 生産が知られているが、糖以外の有機物によりエネルギー生産が行われるという報告はないが、これらの超好熱アーキアはアミノ酸により良好に生育できることからアミノ酸を利用したエネルギー生産系が存在することが示唆される。研究代表者は 2 種類の L-プロリン脱水素酵素複合体が超好熱アーキアに存在することを見出し、これらが呼吸鎖を介したエネルギー生産に関与するのではないかと考えている。一方でこの酵素は、電子受容体としてジクロロインドフェノールやフェリシアン化カリウムなどの人工色素を利用でき、バイオセンサーやバイオ電池の素子として有用であることが分かっている。本研究では、両酵素の生理的機能の解明と応用開発の一環として、これら 2 種類の L-プロリン脱水素酵素複合体の機能と構造を明らかにして、その電子伝達機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) $\alpha_4\beta_4$ 型の ProDH の結晶化と X 線結晶構造解析及び電子伝達経路の解析
①既に明らかにした *P. horikoshii* 由来の $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDH の立体構造は、電子伝達に重要と考えられる鉄イオウクラスター (ISC) が壊れた状態であった。これは、本酵素の精製中や結晶化時に ISC が酸化されたのではないかと考えられた。そこで、精製用バッファーや結晶化バッファーに酸化防止剤である DTT を加えて、酵素の調製及び結晶化を行った。
②既に得られた結晶構造の分解能は 2.9 Å であり、より詳細な解析を行うためにはさらに高分解能のデータを得ることが必要である。これまでに用いてきた結晶化試薬に加え、様々な結晶化試薬を用いて結晶化条件を再スクリーニングした。
③本酵素の反応機構を明らかにするために、基質との共結晶化も試みた。本酵素を基質である L-プロリン、もしくは基質との競合阻害剤であるピロリン-5-カルボン酸と混合したサンプルについて、結晶化スクリーニングを行った。

①②③により得られた結晶は回折実験を行い、結晶の質を評価した。

(2) $\alpha_4\beta_4$ 型のProDHの変異酵素の作製と機能解析

以前得た結晶構造によると、本酵素は2つの α サブユニットの381番目のCys残基同士が分子間ジスルフィド結合を形成していることが明らかになっている。このジスルフィド結合は、 $\alpha_4\beta_4$ 構造という立体構造の形成や高い耐熱性の要因ではないかと考えられたが、実際に確かめられてはいない。そこで、このCys残基をSerに変異させたC381Sを作製し、立体構造形成やタンパク質安定性に与える影響を解析した。

C381Sは、既に構築しているpETベクターによる大腸菌発現系を利用して部位特異的変異を導入することにより作製した。精製はこれまでの方法で行い、ディスクゲル電気泳動や非還元SDSゲル電気泳動により、評価した。

(3) $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のProDHの結晶化とX線結晶構造解析

①まだ構造を明らかにできていない $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のProDHについて、*T. profundus*の酵素を用いて結晶化スクリーニングを行い、X線結晶構造解析による立体構造の決定を目指した。酵素の精製をより簡便にし、より大量精製を可能にするため、Hisタグを付加した酵素の調製を検討した。各サブユニットの1つだけにHisタグが付加されるような大腸菌発現系を計4種類 (α -His、 β -His、 γ -His、 δ -His) を作製し、それぞれを大腸菌で発現させ、熱処理とニッケルカラムにて精製した。各精製酵素はディスクゲル電気泳動及びSDSゲル電気泳動により評価した。また精製標品の動的光散乱解析を行い、結晶化に適した酵素を選択した。結晶化スクリーニングは市販のキット用いて行った。

② $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のProDHの α 、 γ 、 δ サブユニットにはそれぞれ、[2Fe-2S]、[8Fe-8S]、[Fe-4Cys]のISCが含まれることが推定されている。鉄含量の測定やスペクトル解析などによりこれらのISCは容易に酸化されてしまうことが示唆された。この酸化によりISC部分が不安定になり、結晶が成長しないことが考えられたため、これらのISCを形成するCys残基をSerに置換し、ISC形成ができないようにした変異酵素を作製した。まず、各サブユニットのISC形成に関与するCysをそれぞれSerに置換した (α : 4残基、 γ : 8残基、 δ : 4残基)。これらの変異サブユニットとHisタグ付き β サブユニットを用いて、 $\alpha_{mut}\beta_{his}\gamma\delta(\alpha\text{-mut})$ 、 $\alpha\beta_{his}\gamma_{mut}\delta(\gamma\text{-mut})$ 、 $\alpha\beta_{his}\gamma\delta_{mut}$

(δ -mut)、 $\alpha_{mut}\beta_{his}\gamma_{mut}\delta$ ($\alpha\gamma$ -mut)、 $\alpha_{mut}\beta_{his}\gamma\delta_{mut}$ ($\alpha\delta$ -mut)、 $\alpha\beta_{his}\gamma_{mut}\delta_{mut}$ ($\gamma\delta$ -mut)、

$\alpha_{mut}\beta_{his}\gamma_{mut}\delta_{mut}$ ($\alpha\gamma\delta$ -mut) の7つの変異発現系を構築した。各変異酵素はネイティブ酵素と同様に発現・精製し、複合体形成の有無、精製の可否、酵素の純度と単一性を検討した。

4) ProDH活性触媒サブユニットの機能解析

$\alpha_4\beta_4$ 型、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のどちらのProDH複合体においても、ProDH活性を触媒するのは β サブユニットであり、これらは互いに50%以上の相同性を示す。しかし、複合体解析や β サブユニット単独での解析から、各 β サブユニットのProDH活性における比活性や安定性は異なることが予想された。また、現在までに $\alpha\beta\gamma\delta$ 型ProDH複合体を用いてセンサー用素子としての応用開発を行っているが、この酵素はNADH脱水素酵素活性も有していること、複雑な複合体構造を有していることなどから、より簡単な構造の酵素を用いることが望まれている。

*Pyrococcus*属、*Thermococcus*属の超好熱アーキアは両タイプの複合体酵素を有していることから、多種類の β サブユニットを解析することで、より高活性で安定性の高いProDHが発見できることが予想される。そこで、*P. horikoshii*、*P. furiosus*、*T. profundus*、*T. kodakaraensis*の4種類のアーキアに存在する8種類の β サブユニット遺伝子の発現系を構築し、その酵素化学的性質について解析した。これらはいずれもHisタグ配列が付加されるように発現系を構築し、Hisタグカラムだけで精製した。精製酵素の最適温度、熱安定性、速度論、基質特異性、電子受容体特異性、基質アナログによる阻害などを解析した。

4. 研究成果

(1) $\alpha_4\beta_4$ 型のProDHの結晶化とX線結晶構造解析及び電子伝達経路の解析

①本酵素はDTT存在下でも、これまでの精製条件と同様の方法で単一に精製することに成功した。結晶化バッファーにもDTTを加えた条件で、これまでと同様の形状の結晶を得ることに成功した。しかし、回折実験を行ったところ、その分解能は4Å程度であり、詳細な構造解析には至らなかった。

②高分解能の結晶化条件をスクリーニングするため、市販の様々なキットを用いて、結晶化実験を行った結果、7種類の条件で良好な結晶が得られた。これらの結晶について回折実験を行ったが、分解能が3Åを超えるものはなかった。

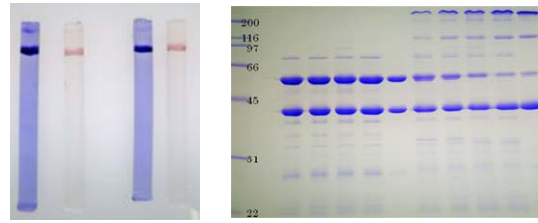
③基質や阻害剤との共結晶化実験にお

いても、複数の結晶を得ることはできず、分解能が低く(4~5Å)、基質との結合を確認するには至らなかった。

これらの結果から、以前構造解析に用いた条件でも、同程度の分解能が得られていないことが明らかになった。この対策として今後、以前の条件を細かく換えた条件でのスクリーニングを行い、結晶の質の改善を図る。そのうえで、もう一度、再実験を行い、高分解能での構造解析を行う予定である。特にISCの壊れていない結晶の構造解析は、電子伝達経路の解析に重要なので、引き続きスクリーニングを進める。

(2) $\alpha_4\beta_4$ 型のProDHの変異酵素の作製と機能解析

C381Sの変異体は従来と同じ精製方法で精製できた。この精製法は粗酵素液に対する90°C10分間の熱処理を含んでおり、酵素の耐熱性に大きな変化は認められないことが示唆された。精製酵素のディスクゲル電気泳動の結果もネイティブ酵素との大きな違いは認められなかった(下図左)。このことはジスルフィド結合の有無にかかわらず $\alpha_4\beta_4$ 構造をとっていることを示している。一方で、ネイティブ及びC381Sの非還元SDS-PAGEを行った結果、両者に大きな違いが認められた。C381Sは予想通りバンドの位置に変化は見られないものの、ネイティブでは、精製直後から高分子量の位置にバンドがみられ、かつそのバンドは日数の経過に伴って増加した(下図右)。非還元SDS電気泳動では、ジスルフィド結合が切断されず、理論的には α サブユニットの2倍の分子量でバンドが検出される。実際に、112kDa付近にバンドがみられ、これがジスルフィド結合した α サブユニットのダイマーであると考えられる。一方で、さらに高分子量の位置にもバンドがみられたが、これはサブユニットにまで解離しなかった複合体構造のものであると推定される。これらの結果から、構造解析で認められた α サブユニットのジスルフィド結合は、酵素の精製や結晶化という過程を経ることにより形成されたことを示唆している。両酵素の酵素化学的性質を検討したところ、 K_m 値などに違いは見られなかったが、熱安定性においてはむしろC381Sの方がわずかに高くなった。



(左図) ディスクゲル電気泳動によるタンパク染色と活性染色。左: C381S; 右: ネイティブ

(右図) 非還元 SDS-PAGE。左から、マーカー、C381S 熱処理 (0, 1, 4, 6 日後)、C381S 精製酵素、ネイティブ熱処理 (0, 1, 4, 6 日後)、ネイティブ精製酵素

3) $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のProDHの結晶化とX線結晶構造解析

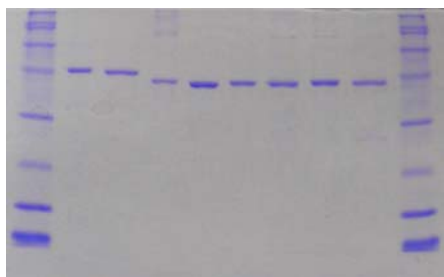
①構築した4種類の発現ベクターを用いて、酵素を発現させ、熱処理と簡易なHisタグカラムによる精製を行った結果、いずれの酵素もカラムに吸着できることが分かった。電気泳動により複合体形成を確認した結果も良好で、いずれの酵素も全てのサブユニット成分を含んでいた。このことからHisタグ配列が複合体形成に影響しないこと、そのHisタグは溶媒側にさらされていることを確認できた。精製条件を詳細に検討した結果、超音波破碎による粗酵素液の調製後、70°C10分の熱処理とHisタグカラム(20mMイミダゾールでの吸着及び洗浄と20~100mMイミダゾールでの溶出)により高度に精製できることを確認した。各酵素のNative-PAGE及び光散乱解析を行った結果、 δ -Hisが比較的単分散性を示したので、この酵素を用いて、結晶化スクリーニングを行った。これまで、のべ2000条件程度のスクリーニングを行ったが、まだ結晶は得られていない。

②本酵素の結晶が得られない状況を打開するため、ISCを欠損させた酵素の調製を試みた。前述と同様に粗酵素液を熱処理とHisタグカラムによって精製した結果、 γ サブユニットに変異を加えた γ -mut、 $\alpha\gamma$ -mut、 $\gamma\delta$ -mut、 $\alpha\gamma\delta$ -mutでは、 γ サブユニットのバンドを検出できなかった。このことは γ サブユニットのISC変異により正しい構造を形成できなくなったことを示している。一方で、 α -mut、 δ -mut、 $\alpha\gamma$ -mutは4サブユニットによる複合体を形成していたため、さらに精製を進めた。精製は上述のように行い、いずれの変異酵素もSDS-PAGEで光度に精製できていることを確認できた。各酵素のNative-PAGE及び光散乱解析を行った結果、 $\alpha\gamma$ -mutが他に比べて比較的単分散性を示したので、この酵素を用いて、結晶化スクリーニングを行っているが、まだ結晶は得られていない。これらの酵素については今後、原子吸光やEPRによる鉄の定量解析やISC種の同

定も行っていく予定である。

4) ProDH活性触媒サブユニットの機能解析
8種類のβサブユニットはHisタグカラムだけでほぼ均一に精製することに成功した(下図)。熱安定性と最適温度の解析の結果、 $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDHに由来するβサブユニットは、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のものより高い安定性及び最適温度を示した。全ての酵素がL-プロリンを唯一の基質とし、基質アナログであるピロリドン-5-カルボン酸で競合阻害を示す一方で、L-プロリンに対するKm値やVmax、阻害剤に対するKi値にはタイプの違いによる傾向は認められず、Km値は0.39~4.2 mM、Vmax値は3.5~33 U/mg、Ki値は0.15~1.8 mMと幅広い値を示した。また、電子受容体特異性には複合体タイプにより好みがあり、 $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDHに由来するβサブユニットはフェリシアン化カリウムを、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型のもはDCIPを良好な電子受容体とすることが明らかになった。電子受容体特異性解析の一環として、酸素に対する特異性、すなわちオキシダーゼ活性を測定した結果、全てのβサブユニットはわずかではあるが(DCIPの1%以下)、オキシダーゼ活性を有することが明らかになった。

これらの結果を複合体構造での値と比較すると非常に興味深いことが明らかになった。*P. horikoshii*の $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDHはVmax、Km値は2.5 U/mg、4.1 mMであるのに対して、そのβサブユニットでは、21 U/mg、1.4 mMとなり、*T. profundus*の $\alpha\beta\gamma\delta$ 型 ProDHが14 U/mg、2.5 mMであるのに対して、そのβサブユニットでは、33 U/mg、1.8 mMとなった。またオキシダーゼ活性については特に $\alpha_4\beta_4$ 型 ProDHで、DCIPに対して40%程度の相対活性を示し、βサブユニットに比べて、非常に高い相対活性を示した。これらの結果は、複合体状態と単独発現状態で、その性質が大きく異なっていることを示しており、単独状態での構造解析も行うことで、センサーとして利用する際の機能や安定性の強化、配向調節による検出感度の増幅など、有用な情報が多く得られると考えられる。



(図) 8種類のβサブユニットのSDS-PAGE。

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0件)

[学会発表] (計5件)

①川上竜巳、野口千明、東麻梨江、櫻庭春彦、大島敏久

超好熱アーキアのL-プロリン脱水素酵素サブユニットの機能解析、2011年3月26日(発表会は中止)、京都女子大学・京都

②野口千明、東麻梨江、櫻庭春彦、大島敏久、川上竜巳

超好熱アーキアのL-プロリン脱水素酵素サブユニットの比較解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド・兵庫

③川上竜巳、櫻庭春彦、大島敏久

超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* の $\alpha_4\beta_4$ 型色素依存性L-プロリン脱水素酵素複合体のシステイン残基の役割、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド・兵庫

④野口千明、東麻梨江、櫻庭春彦、大島敏久、川上竜巳

超好熱アーキアのL-プロリン脱水素酵素サブユニットの機能解析、日本農芸化学会西日本支部大会、2010年9月18日、崇城大学・熊本

⑤東麻梨江、川上竜巳

超好熱アーキア由来色素依存性L-プロリン脱水素酵素複合体のL-プロリン脱水素酵素サブユニットの機能解析、蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2009年9月10日、唐津シーサイドホテル・佐賀

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 竜巳 (KAWAKAMI RYUSHI)

佐賀大学・総合分析実験センター・助教

研究者番号：90380120