

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780098

研究課題名（和文）新規構造をもつ色素依存性プロリン脱水素酵素の構造と機能解析

研究課題名（英文）Characterization and structural analysis of novel dye-linked L-proline dehydrogenase

研究代表者

里村 武範（SATOMURA TAKENORI）

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50412317

研究成果の概要（和文）：本研究では、現在までに見いだされている 2 種類のタイプの色素依存性プロリン脱水素酵素(Dye-ProDH)とは、構造、酵素化学的性質が大きく異なる第 3 のタイプの新規色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の機能と構造解析を行った。本酵素はホモ二量体構造をとり、既知のヘテロオリゴマータイプの酵素とはサブユニット構造が大きく異なっていた。また、本酵素の立体構造解析にも成功し酵素と基質との親和性に関与するアミノ酸残基の特定、および電子受容体特異性に関与するアミノ酸残基の特定に成功した。

研究成果の概要（英文）：Until now, two different types of Dye-ProDHs have been discovered in hyperthermophile. We have found the third novel type of Dye-ProDH whose molecular composition and properties were completely different. Structure determination was performed. As the result, we succeeded the structural determination at high resolution. In addition, we succeeded the identification of the amino acid which is involved in substrate affinity and electron-transfer of the enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：超好熱菌、色素依存性脱水素酵素、L-プロリン脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

色素依存性脱水素酵素とは、有機酸、糖、アミノ酸などの生体物質の酸化還元反応を触媒する一群の酵素である。これらの酵素は補酵素として FAD、FMN、PQQ などを補酵素として有しており、2,6-ジクロロインドフ

ェノール（DCIP）のような人工色素を電子受容体とすることが可能であることから色素依存性脱水素酵素と呼ばれている。色素依存性脱水素酵素は生体内ではユビキノンやシトクロム c などを電子受容体とし電子伝達系の初発酵素として、エネルギー生産に重要な役割を果たしていると考えられている。ま

た、これら酵素群は先述の人工色素をメディエーターとして酵素反応と電極を直接結び付けることが可能であることから、物質の濃度を電気化学的信号として簡便に測定できるバイオセンサー用素子や生体物質を起電力とするバイオ電池用素子としての利用が期待されている。しかし、現在までに報告されている色素依存性脱水素のほとんどは、安定性に問題があり、バイオセンサー用素子やバイオ電池用素子としての応用利用例は、同じ酸化還元酵素である NAD(P)依存性脱水素酵素に比べて大幅に遅れている。そこで、研究代表者は安定性の高い酵素が数多く報告されている超好熱菌に着目して、色素依存性脱水素酵素の機能開発を進めてきた。その結果、超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis*、*Aeropyrum pernix* より Dye-ProDH を見出すことに成功した。現在までに超好熱菌由来 Dye-ProDH は *Thermococcus* 属と *Pyrococcus* 属の 2 属にヘテロオクタマー ($\alpha 4\beta 4$) 型とヘテロテトラマー ($\alpha\beta\gamma\delta$) 型の 2 種のアイソザイムが見出されている。これらヘテロオリゴマー型 Dye-ProDH は超好熱菌由来酵素であるため非常に高い安定性を有し、バイオセンサーやバイオ電池用素子として非常に有望な酵素であることが示されている。しかしながら、これら Dye-ProDH は四次構造が複雑なため大腸菌内で組換えタンパク質を大量に発現させることが困難であるという欠点があった。さらに、四次構造の複雑さから、酵素内電子伝達経路に関する情報も乏しく、酵素の分子構造の複雑さがバイオセンサーやバイオ電池への応用への律速となっていた。研究代表者が見出した Dye-ProDH は予備実験の段階ではホモダイマーを取っており、既存の Dye-ProDH と比較して非常にシンプルな四次構造を有していることが明らかとなっていた。このことから、本酵素の機能解析と立体構造解析を進めることは、Dye-ProDH のバイオセンサーやバイオ電池用素子としての応用開発を進めるうえで非常に重要である。

2. 研究の目的

Dye-ProDH は人工の酸化還元色素を電子受容体とすることが可能である。人工酸化還元色素は電極との間で直接電子授受が可能であることから、人工色素をメディエーターとすることによって酵素反応と電極を結び付けることが可能である。そのため、プロリン定量用バイオセンサーやプロリンを起電力とするバイオ電池用素子として利用が期待されている。しかしながら、本酵素の分子内の電子伝達経路の解析などの酵素化学的、立体構造学的知見が少ない。バイオセンサー

やバイオ電池用素子など応用開発を行うに当たって、酵素の基質特異性の改良や、高出力な電極を作製するための電極上での酵素の配向性を持たせた固定化法の開発には、分子内の電子伝達経路、立体構造情報は必須である。本研究では、超好熱アーキアから見出した新規 Dye-ProDH の機能と構造を明らかにすることによって、本酵素の応用利用に向けた機能開発を進めることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) *Pyrobaculum calidifontis*、*Aeropyrum pernix* 由来新規 Dye-ProDH の機能解析

①超好熱アーキア *P. calidifontis* の粗酵素液より Dye-ProDH 活性を検出した。そこで詳細な機能解析を行うために、本酵素を精製し酵素化学的諸性質の解析を行い、大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行った。

② *P. calidifontis* 由来 Dye-ProDH の一次構造から、超好熱アーキア *A. pernix* に Dye-ProDH と相同性のあるホモログを見出すことができた。そこで、*A. pernix* 由来 Dye-ProDH ホモログの大腸菌によるタンパク質発現系を構築し発現タンパク質の機能同定と詳細な機能解析を進めた。

(2) 新規 Dye-ProDH の X 線結晶構造解析による構造と機能の解析

① *P. calidifontis*、*A. pernix* 由来の新規 Dye-ProDH の立体構造を明らかにするためにタンパク質結晶化スクリーニングキットを用いて酵素の結晶化条件のスクリーニングを行った。

② 良質な結晶が得られた *A. pernix* 由来 Dye-ProDH について X 線構造解析を行い本酵素の詳細な立体構造解析を行った。

③ 既知の超好熱菌由来 Dye-ProDH 立体構造と本研究で明らかにした新規 Dye-ProDH との立体構造を比較することによって、酵素反応に関与するアミノ酸残基の抽出酵素分子内での電子伝達経路の解析を行った。

4. 研究成果

(1) *P. calidifontis*、*A. pernix* 由来新規 Dye-ProDH の機能解析

① *P. calidifontis* の粗酵素液より Dye-ProDH を 3 段階の精製方法によって電気泳動的に単一に精製することに成功した。精製酵素の酵素化学的性質を解析した結果、本酵素は既知の超好熱菌由来 Dye-ProDH と同様に高い安定性を有する酵素であることが判明した。また、既知 Dye-ProDH は基質として L-プロリンのみを利用していたのに対し本酵素は L-プロ

リンの他にヒドロキシプロリンを利用することができる点で異なっていた。さらに、本酵素の四次構造を解析した結果、ホモダイマー構造をとることが明らかとなった。これまで報告されている酵素はヘテロオリゴマータイプのものしか無く、本酵素は今までに無い新規タイプの Dye-ProDH であることが明らかとなった。本酵素の単純な四次構造は、電極用素子として電極に酵素を固定化する際に非常に有用な性質であり、酵素機能電極用素子として有望な酵素であることが明らかとなった。また、本酵素の N 末端アミノ酸配列を解析し、一次構造の同定に成功した。本酵素の一次構造から大腸菌によるタンパク質の発現系の構築にも成功した。

② *P. calidifontis* 由来 Dye-ProDH の一次構造からホモログタンパク質の検索を進めたところ、超好熱アーキア *A. permix* ゲノム中にホモログタンパク質を見出すことに成功した。そこで、ホモログタンパク質を大腸菌に発現させ、組換えタンパク質の機能同定を行った。その結果、ホモログタンパク質は Dye-ProDH 活性を有していた。本酵素の詳細な機能解析を進めた結果、*P. calidifontis* 由来 Dye-ProDH と同様、ホモダイマータイプの新規 Dye-ProDH であることが明らかとなった。*P. calidifontis*、*A. permix* 由来 Dye-ProDH と既知の Dye-ProDH の酵素化学的性質、一次構造、遺伝子クラスターの比較を行ったところ、超好熱アーキア由来 Dye-ProDH は3つのグループに分かれることが明らかとなった。

(2) 新規 Dye-ProDH の X 線結晶構造解析による構造と機能の解析

① 大腸菌によるタンパク質発現系の構築が成功した *P. calidifontis*、*A. permix* 由来 Dye-ProDH について、組換えタンパク質を用いてタンパク質の結晶化条件の検討を行った。その結果、*A. permix* 由来 Dye-ProDH においてタンパク質の結晶化に成功した (図 1)。

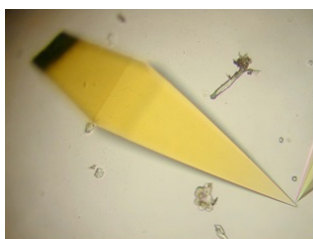


図 1 *A. permix* 由来 Dye-ProDH の結晶

② タンパク質の結晶化に成功した *A. permix* 由来 Dye-ProDH について X 線構造解析を行ったところ、最大分解能 1.92 Å で立体構造解析に成功した。(図 2)。本酵素の立体構造はサブユニット同士が結晶学的な 2 回対象によって位置づけられるダイマー構造をとって

いた。さらに本酵素はひとつのサブユニットに基質である L-プロリン、補酵素である FAD が 1 分子ずつ、水分子が 204 分子存在していることが確認できた (図 3)。

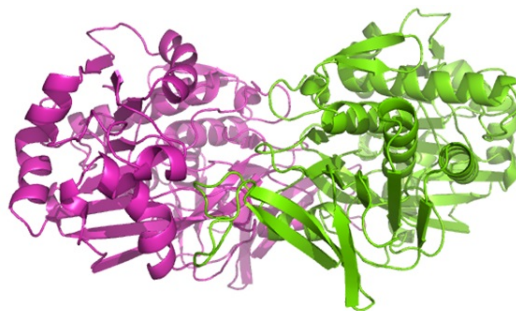


図 2 *A. permix* 由来 Dye-ProDH のダイマー構造

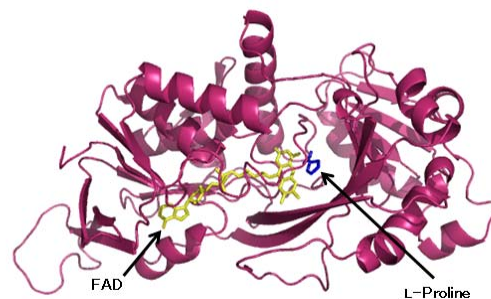


図 3 *A. permix* 由来 Dye-ProDH のモノマー構造 黄色のスティックモデル: FAD、青色のスティックモデル: L-プロリン

③ 本研究で明らかとなった *A. permix* 由来 Dye-ProDH の立体構造と既に立体構造解析が行われ詳細な酵素の構造が明らかにされているヘテロオリゴマータイプの Dye-ProDH との構造比較を行ったところ、酵素の C 末端側に大きな違いが認められた。既知の Dye-ProDH については C 末端の 7 アミノ酸残基の電子密度が不明瞭で構造が決定できていなかったが、本研究で明らかとなった *A. permix* 由来 Dye-ProDH に関しては C 末端のアミノ酸残基であるロイシンまで明確に確認できていた。本酵素の C 末端鎖は FAD 結合ドメインから基質結合部位に向かって伸びており、C 末端アミノ酸であるロイシンは基質結合部位に蓋をするような形で存在していた。さらに、この C 末端ロイシンのカルボキシル基が基質である L-プロリンと水分子を介して水素結合を形成していることが明らかとなった。このことから、本酵素の C 末端のロイシン残基が酵素活性に重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで、C 末端のロイシンを除去した変異酵素を作成し、その基質であるプロリンに対する K_m 値を測定したところ野生型酵素の値に比べて

約 800 倍大きいことが分かった。しかし、変異酵素の K_{cat} 値は野生型酵素のそれとほとんど変わらなかった。このことから C 末端のロイシンは触媒活性には直接関与しないが、基質の親和性に関与していることが判明し、酵素反応機構の一端を明らかにすることができた。さらに、2 種類の Dye-ProDH の詳細な立体構造比較を行った。既に立体構造が明らかにされているヘテロオリゴマータイプ Dye-ProDH は補酵素として FAD、FMN、鉄、ATP を有しており立体構造における補酵素の位置関係から基質である L-プロリンの電子が FAD に伝達され FADH₂ となった後、FMN へと受け渡され、最終的に鉄へと伝達されると予測されている。この予測されている電子伝達における FAD から FMN への電子の授受には 47 番目のシステイン残基が重要であると予測されている。そこで、47 番目のシステイン残基に相当するアミノ酸残基を *A. pernix* 由来 Dye-ProDH で特定を行ったところ、同じ 47 番目のセリン残基であることが判明した。そこで、セリン残基をシステイン残基に置換した変異酵素を作成し、酵素化学的性質を解析したところ、脱水素酵素活性が顕著に低下したが酸化酵素活性の増大が見られ、電子受容体特異性に大きな変化が認められた。このことから、本酵素の 47 番目のセリン残基は酵素内電子伝達に重要な役割を果たしていることが判明した。このことから、現在まで予測の域を脱しなかった Dye-ProDH 分子内電子伝達経路に関わるアミノ酸残基の同定に成功した。さらに、この結果は、本酵素をバイオセンサーやバイオ電池用素子などの酵素機能用電極素子利用する際の重要な情報になると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

① 里村武範、川上竜巳、櫻庭春彦、大島敏久

フラビン含有色素依存性脱水素酵素の機能・構造解析とその応用

バイオサイエンスとインダストリー、**70**巻、340-345、(2012)、査読なし

② H. Sakuraba, T. Satomura, R. Kawakami, K. Kim, Y. Hara, K. Yaneda, T. Ohshima
Crystal structure of novel dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*.

J. Biol. Chem. **287**, 20070-20080, (2012), 査読あり

③ T. Satomura, Y. Hara, S. Suye,

H. Sakuraba, T. Ohshima

Gene expression and characterization of a third

type of dye-linked L-proline dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*.

Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**, 589-593, (2012), 査読あり

④ T. Satomura, X. Zhang, Y. Hara, K. Doi, H. Sakuraba, T. Ohshima

Characterization of a novel dye-linked L-proline dehydrogenase from an aerobic hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis*.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**, 1075-1082, (2011), 査読あり

⑤ T. Satomura, H. Sakuraba, Y. Hara, T. Ohshima

Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel dye-linked L-proline dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*.

Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. **66**, 1508-1510, (2010), 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① T. Satomura, R. Kawakami, S. Suye, H. Sakuraba, T. Ohshima

Functional and structural characterization of Dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophiles

9th International Congress On Extremophiles, 2012 年 9 月 13 日、Hotel NH Central Convenciones セビリア (スペイン)

② 里村武範、川上竜巳、末信一朗、櫻庭春彦、大島敏久

好気性超好熱アーキア *Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造解析

2012 年度農芸化学学会大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学、京都

③ 里村武範、川上竜巳、末信一朗、櫻庭春彦、大島敏久

クレンアーキオータに存在する新規ホモダイマー型色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の機能解析

第12回極限環境生物学会、2011年11月28日、長崎大学、長崎県

④ 里村武範、櫻庭春彦、大島敏久

色素依存性脱水素酵素の網羅的な機能解析
日本農芸化学会中四国支部例会第 28 回講演会、2010 年 9 月 25 日、香川大学、香川

⑤ 里村武範、原佑介、櫻庭春彦、大島敏久

クレンアーキオータに存在する新規色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造と機能解析

酵素補酵素研究会、2010年9月11日、西日本総合展示場、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里村 武範 (SATOMURA TAKENORI)
福井大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：50412317

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

櫻庭春彦 (SAKURABA HARUHIKO)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：90205823

大島敏久 (OHSHIMA TOSHIHISA)
九州大学・農学研究科・教授
研究者番号：10093345