

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580120

研究課題名(和文)細菌アロステリックL-乳酸脱水素酵素の恒常的高活性型酵素への変換

研究課題名(英文)Conversion of bacterial allosteric L-lactate dehydrogenases to constitutively active enzymes

研究代表者

田口 速男 (TAGUCHI, Hayao)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号：90188136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：LCLDHにおいて、S67E、N68D、E178K、A235K置換は相加的にFBP非依存的活性を上昇させ、結晶解析により、置換残基がQ軸間に塩橋を形成することが示された。LPLDHでは、Asp68の置換によって基質結合にホモトロピックなアロステリック協同性が生じた。TCLDHでは、LCLDHと同様な置換(Q変異)はVmax値を増大させ、R173QとR216Lの置換(P変異)は基質Km値を顕著に減少させ、両変異はFBP非依存的活性と熱安定性を加算的に上昇させた。これらの解析から、LCLDHとTCLDHは異なる構造変化を起こし、恒常的活性化には異なる設計が有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：For LCLDH, S67E, N68D, E178K and A235K replacements additively increased the FBP-independent activity, reducing the substrate Km values. The X-ray crystallography indicated that these mutations introduced the inter-subunit salt bridges between the Q-axis related subunits. For LPLDH, D68N and D68H replacements consistently changed the hyperbolic substrate saturation curves to the sigmoidal ones. In the case of TCLDH, L67E, N68D, E178K and A235K (or A235R) replacements (Q mutations) only slightly improved substrate Km in the absence of FBP, though they improved Vm values, instead R173Q and R216L replacements (P mutations) markedly improved the substrate Km. The P-axis and Q-axis mutations additively improved the FBP-independent activity and thermal stability. Structural comparison indicated that LCLDH and TCLDH exhibit greatly different structural changes, and therefore require the different designs that introduce the constitutively high catalytic activities.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アロステリック特性 乳酸脱水素酵素

## 1. 研究開始当初の背景

細菌のL-乳酸脱水素酵素(LDH)はNADを補酵素としてピルビン酸とL-乳酸間の酸化還元反応を触媒し、嫌氣的解糖と乳酸発酵の鍵を担う酵素である。微生物のLDHは多岐に分岐進化し、その酵素的性質やアミノ酸配列は多様である。特に、多くの細菌のLDHは、解糖系の中間体産物フルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)を活性化因子とするアロステリック酵素である。これらの酵素は、一般に、FBP依存的に基質ピルビン酸に対する親和性を向上させるが、FBPが非存在下でも比較的高い活性を発揮するものから、全く活性を発揮できないFBP絶対要求性を示すものなど、FBPに対する依存性は多様である。細菌LDHは、実用面での利用に期待がもたれるが、それらのFBP依存性は利用上で不利な要因である。特に、高い安定性をもつ*Thermus*属、*Thermotoga*属などの高度好熱菌LDHは、いずれも高いFBP依存性を示す。

申請者らは、*Lactobacillus casei*のLDH(LCLDH)において、FBPや基質類似体などのアロステリック因子を結合していない活性化状態と不活性化状態の2つの立体構造を決定し、LCLDHのアロステリック転移がMonod-Wyman-Changeux(MWC)モデルにしたがい、基質やFBPと低親和性の不活性化状態(T状態)と、高親和性の活性化状態(R状態)の間にアロステリック平衡が存在することを示した。LCLDHは同一サブユニット4個からなる4量体酵素であり、P、Q、R軸の3つの対称軸をもつ。2状態間では、4次構造が大きく変化し、これと連動してQ軸サブユニット間接触面近傍の、基質結合に必須なArg171のグアニジウム側鎖が大きく方向を変える。同様な構造変化は、進化的に隔たる*Bifidobacterium longum*のLDHや、*Thermus caldophilus*のLDH(TCLDH)にもみられ、アロステリック型LDHに共通な構造変化であることが示唆される。

一方、LCLDHと近縁でありながら恒常的に高活性を発揮する*L. pentosus*の非アロステリック型LDH(LPLDH)は、LCLDHのR状態と類似する4次構造をもつが、Q軸サブユニット間に、Arg171、Lys178、Lys235と、隣接サブユニットのGlu67、Asp68との間で形成される特異なサブユニット間塩橋ネットワークをもつ。相当部位をLPLDH様のアミノ酸で置換した変異型LCLDHは、FBP非依存的に高活性を示す。これらの残基は、必須なArg171をのぞくと、アロステリックLDHには保存されていないが、細菌の非アロステリックLDHには高い保存性がみられる。さらに興味深いことに、LDHと共通の折れたたみ構造をもつリンゴ酸脱水素酵素(MDH)の多くにもこれらの残基とネットワークの一部、あるいは全部が保存されている。また、配列データベース上には、これらの残基を部分的にもつLDH配列も多く存在し、このネットワーク相当部位の変化が、

細菌LDHの調節機能を分岐させる鍵であることを示唆している。

一般に、アロステリックLDHの安定性は、FBPの存在下で増大する。Q軸間塩橋ネットワーク導入変異型LCLDHは、FBP非存在下で野生型酵素よりもむしろ低い熱安定性を示すが、FBP存在下では、より顕著に安定化され、野生型酵素よりも高い熱安定性を示す。この結果は、R状態は本来的にT状態よりも不安定であること、ただし、FBPによって優先的に安定化されることを示しており、MWCモデルとよく合致する。また、塩橋ネットワークの導入は、LCLDHの変性への活性化エンタルピーを大きく増大させる。これらの事実は、アロステリック特性や塩橋ネットワークが、いずれも酵素の安定性に深く関与することを示している。

## 2. 研究の目的

### 概要

LCLDHの非アロステリック型改変について、個別のアミノ酸置換の効果を詳細に解析するとともに、他の多様な性質の細菌アロステリックLDHに同様なアミノ酸置換を導入して、酵素学的性質の変化を解析する。これを通して、細菌LDHを非アロステリック化する設計法の確立と、細菌LDHの分岐進化に本質的な鍵構造の解明をはかる。

### 主方針

1. LCLDHとLPLDHの構造-機能相関の解明。2つのLDHにおけるQ軸サブユニット間の塩橋と、アロステリック効果との関連を、立体構造解析と当該アミノ酸の置換変異を通して解明する。
2. 他の細菌LDHの非アロステリック化高度好熱菌*Thermus caldophilus*のLDH(TCLDH)や、耐塩乳酸菌*Tetragenococcus halophilis*のLDH(THLDH)など、特徴的な性質をもつ細菌のアロステリックLDHに、LPLDHの塩橋ネットワークを導入し、その酵素学的性質と熱安定性への影響を解析する。特に、TCLDHは、既知のLDHのなかでも最も高い安定性を示す酵素のひとつであり、その恒常的活性化は、有用酵素の作出において期待がもたれる。加えて、TCLDHは乳酸菌LDHと進化的に遠縁であり、非アロステリック化にQ軸間塩橋ネットワークの普遍的な有効性があるかどうかを知る上で格好でもある。そこで、本研究では、TCLDHのアロステリック調節機構の解明と、その恒常的活性化に特に重点をおく。

## 3. 研究の方法

主に以下の4種の解析を遂行する。

- (1) 塩橋ネットワーク導入によって非アロステリック化された変異型LCLDHの立体構造解析 野生型LCLDHの結晶化条件をもとに、変異型酵素の結晶から反射データを収集し、立体構造モデルを構築する。

## (2) 変異型 LCLDH と変異型 LPLDH の解析

LPLDH の特異な塩橋ネットワークは、一方のサブユニットの Arg171、Lys178、Lys235 と、Q 軸隣接サブユニットの Glu67(Q)、Asp68(Q) との間にある 6 つの塩橋から構成されている。これらのアミノ酸残基のうち、Arg171 は基質結合に必須な残基であり、LPLDH の立体構造上、この残基が Glu67(Q) および Asp68(Q) との間で結ぶ 3 つの塩橋、特に Asp68(Q) との間で形成する 2 つの塩橋が、このネットワークの本質的な中心となっており、他の塩橋はそれを支援するかたちでネットワークに加わっているように見える。そこで、LCLDH においては、これらの変異を個別に導入した変異型酵素を作成し、それぞれの変異の効果解析していく。また、LPLDH ではこれらを欠失した変異型酵素の解析を行う。

## (3) 他のアロステリック LDH の解析

1. TCLDH の解析 同じ *Thermus* 属細菌のもつリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) は、立体構造上、LPLDH ときわめて類似した塩橋ネットワークをもち、さらに、Lys235 が Arg 残基に置換されているため、サブユニット間水素結合の数が増加し、ネットワークがより強化されている。そこで、TCLDH の場合は、当該部位 (Ala235) を Lys だけでなく Arg に置換した変異型酵素もあわせて作成し、その酵素学的性質、熱安定性などを解析する。また、この酵素のさらに高解像度、高信頼度の立体構造解析も試みる。

2. 耐塩性乳酸菌 LDH の解析 LCLDH に近縁な *Enterococcus* 属細菌の LDH (EFLDH) や、醸造乳酸菌 *T. halophilus* の LDH (THLDH)、海洋乳酸菌 *Marinilactobacillus* 属細菌の LDH (MLLDH) などにおいて、Q 軸間塩橋ネットワークの効果解析する。

## (4) 塩橋ネットワーク相当部位以外へのアミノ酸置換の効果解析

TCLDH では、FBP 結合部位の Arg173 や、P 軸サブユニット間近傍の Arg216 の置換によっても、FBP 非依存的な活性が上昇することが知られている。そこで、野生型および Q 軸サブユニット間変異型 TCLDH において、これらの残基にも置換を導入し、その効果を解析する。一方、LCLDH はアロステリック LDH 群の中で、活性化効果に高い pH 依存性を示すという特徴がある。Q 軸サブユニット間変異型 LCLDH も、pH7.0 では pH5.0 よりも活性が低く、その活性は Mn<sup>2+</sup> イオンや低濃度の FBP 添加によって有意に向上する。LCLDH は特異な His205 と His216 残基を P 軸サブユニット接触面近傍にもち、この特異な pH 依存性は、これらの残基が形成する P 軸サブユニット間相互作用の pH 依存的な変化に起因するものと推測される。そこで、野生型および変異型 LCLDH において、これらの候補残基にも置換を導入し、その pH 依存性への効果を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 変異型 *L. casei* の LDH (LCLDH) の立体構造解析 Q 軸サブユニット間 5 残基変異型 LCLDH の 2.6 オングストローム分解能の立体構造解析に成功した。得られた構造は、野生型の活性型酵素のものと同様で、Q 軸間の塩橋ネットワークについては、Lys235-Glu67(Q) 間の距離が塩橋を形成する上でやや離れていた以外は、ほぼ LPLDH のものと同様なネットワークが形成されていることが明らかとなった。

(2) Q 軸間 5 残基変異型 LCLDH における個別の変異効果の解析 LCLDH の不活性型立体構造では、Glu178 が Arg171 と特異なサブユニット内塩橋を形成しており、不活性型構造を安定化させる要因となっていることが示唆される。そこで、まず LCLDH の Glu178 を Gln に置換した変異型酵素を解析した結果、Glu178Gln 変異型酵素は、野生型酵素と比べて、FBP 非存在下でより顕著に高い活性を発揮することが示された。また、Asn68Asp、Ser67Glu、Glu178Lys、Ala235Lys の順に変異を増加させていくと、加算的に FBP 非依存的な活性が増大し、最終的に全ての変異を導入した酵素で最大になった。このことから、Q 軸サブユニット間塩橋は加算的に調節特性に影響を及ぼし、また当該部位のアミノ酸置換変異が、細菌 LDH の調節特性を多様化させる大きな要因となっていることが示された。

(3) *L. pentosus* LDH (LPLDH) のアロステリック化 LPLDH の Asp68 を Asn および His に置換したところ、いずれの場合も基質飽和曲線が双曲線型からシグモイド型に変化した。加えて、基質ピルビン酸の類似体で競争阻害剤であるオキサミド酸存在下では、基質飽和曲線が双曲線に変化し、見かけ上の活性化がみられたことから、この変異型酵素は基質によるホモトロピックなアロステリック活性化効果を示すことが明らかとなった。さらに、FBP によるヘテロトロピックな調節特性の導入をはかるため、FBP 結合部位の Asp188 を His に置換した 2 重変異型酵素の作成を試みたが、この変異型酵素は大腸菌での発現がむずかしいため、現在まで可溶性の変異型酵素を得るに至っておらず、なお発現条件を検討中である。そこで、これと関連して、*L. plantarum* の LDH ホモログ 2 (LPLDH2) の機能解析を行った。*L. plantarum* には LDH ホモログが 2 つあり、このうちの LDH ホモログ 1 (LPLDH1) は、上述の LPLDH と完全に同一なアミノ酸配列をもつのにたいして、LPLDH2 は配列の同一性は高いものの Lys178 が Gln に置換されている。機能解析の結果、LPLDH2 はピルビン酸のかわりにオキサロ酢酸を基質とするリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) であり、しかもシグモイド型のオキサロ酢酸飽和曲線を示すことが明らかになった。また、基質結合部位の Gln102 が Arg に置換されていることが、本酵素が MDH である要因として示唆された。

#### (4) その他のアロステリック LDH の解析

Q 軸変異を導入した変異型 EFLDH は、大腸菌で可溶性酵素がなかなか得られず、現在も発現条件を検討中である。一方、THLDH は、FBP 非存在下でも顕著に活性を示す FBP 非絶対要求型のアロステリック型 LDH であることを明らかにした。この酵素は Asp68 をもち、Q 軸間塩橋ネットワークを部分的にもつことが考えられる。Asp68 を Asn に置換した結果、変異型 THLDH は FBP 非存在下では有意の活性を示さず、FBP 絶対要求型の酵素としての性質を示した。

本研究で最も重点をおいた TCLDH は、FBP 存在下で、 $10^{-3}$  低い基質  $K_m$  値を示し、 $V_{max}$  も 4 倍に増大する。Leu67Glu、His68Asp、Glu178Lys、Ala235Lys または Ala235Arg 全ての変異 (Q-軸変異) を導入した変異型 TCLDH は、FBP 非存在下で、野生型の約 4 倍の  $V_{max}$  を示したが、 $K_m$  値は高々 1/6 にしか減少しなかった。これに対して、Arg173Gln と Arg216Leu の置換 (P-軸変異) によって、 $V_{max}$  値は顕著に向上しなかったが、基質  $K_m$  値は 10-2 に減少した。また、Q-軸変異と P-軸変異は、TCLDH の FBP 非依存的な活性を相加的に向上させた。このことは、これらの変異は互いに独立な機構で、酵素を活性化させることを示唆している。また、Q-軸変異と P-軸変異酵素の熱安定性も相加的に向上させた。活性化と安定化のいずれにおいても、Ala235Lys よりも Ala235Arg 置換がより効果的であったことから、Arg235の方が Lys よりも強い Q-軸間ネットワークを形成できることが示唆された。

一方、TCLDH の不活性化状態 (T 状態) と活性化状態 (R 状態) の立体構造を、それぞれ 1.8、2.0 オングストローム分解能での精密化に成功した。TCLDH の場合は、アロステリック構造変化の中心が 2F ヘリクスの C 末端領域にあり、この領域の動きを通して 2F ヘリクスのみが回転する (図 1)。その結果として、

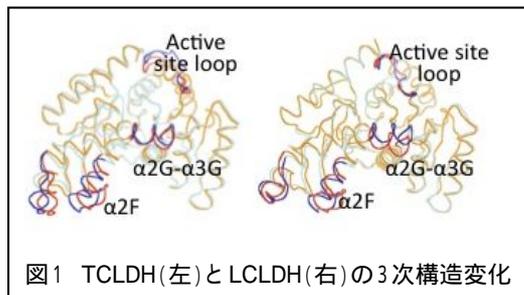


図1 TCLDH(左)とLCLDH(右)の3次構造変化

活性部位や Q 軸サブユニット接触面では、171、178 位のアミノ酸が位置する 2F ヘリクスのみが動き、67、68 位のアミノ酸が位置する C(Q)ヘリクスと、235 位のアミノ酸が位置する 2G ヘリクスはほとんど動かない (図 2)。

これに対して、LCLDH の場合は、アロステリック構造変化の中心が、2F ヘリクスの C 末端領域だけでなく、P 軸を介したサブユニット間連鎖によって、2G-3G 領域にまで拡大している。そして、その結果、活性部位

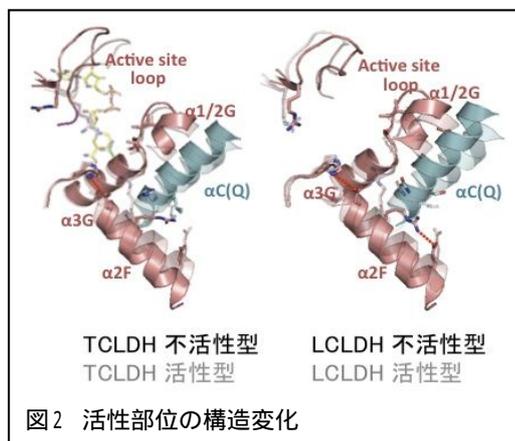


図2 活性部位の構造変化

や Q 軸サブユニット接触面では、2F ヘリクスだけでなく、2G ヘリクスも、さらには、2G-3G 領域と恒常的なサブユニット間水素結合をもつ C(Q)ヘリクスも動く。Q 軸塩橋ネットワークは、2F ヘリクスおよび 2G ヘリクスと、C(Q)ヘリクスの間に形成されるため、このようにこれらのヘリクスがすべて動く LCLDH の構造を活性化型に固定する上で有効であるが、2F ヘリクスしか動かない TCLDH の場合はそれほど効果的ではない。

一方、TCLDH の表面電荷分布をみると、TCLDH には図 3 の青部分に示すように、特異な正電荷クラスターがみられ、これらが活性

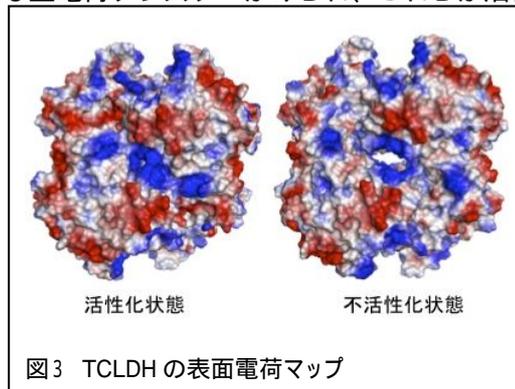


図3 TCLDH の表面電荷マップ

型構造では、サブユニット間領域に集中しているが、不活性化型構造では分散する。このことは、正電荷クラスター間の静電的反発がこの酵素の活性化状態を不安定かさせる要因であることを強く示唆している。Arg173 と Arg216 はこの正電荷クラスターの 1 つを形成しており、同時に 3 次構造変化の中心である 2F ヘリクスの C 末端領域に位置している。したがってこれらの残基を中性のアミノ酸に置換することで静電的反発が弱まり、活性化状態の構造が安定化したものと考えられる。

結論として、Q 軸間塩橋ネットワークの導入は、LCLDH と進化系統的に近縁なアロステリック LDH や、LCLDH と類似したアロステリック構造変化をもつアロステリック LDH の恒常的活性化にはきわめて有効と考えられる。しかし、TCLDH のような、Q 軸サブユニット間や活性部位に大きな構造変化をとまなわないアロステリック LDH の場合にはそれほど

の効果は期待できない。そのかわりに、こうした酵素は静電的反発などの活性化構造を不安定化させる要因をもっており、それらの除去によって恒常的活性化が期待できる。

#### 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 2 件)

宮永 顕正、藤澤 伸介、古川 那由太、荒井 一人、中島将博、田口速男、The crystal structure of D-mandelate dehydrogenase reveals its distinct substrate and coenzyme recognition mechanisms from those of 2-ketopantoate reductase. *Biochem Biophys Res Commun.*、査読有、439 巻、2013、109-114

DOI: 10.1093/jb/mvr100

荒井 一人、市川 淳、野中 真太、宮永 顕正、内木場 裕之、伏信 進矢、田口速男、A molecular design that stabilizes active state in bacterial allosteric L-lactate dehydrogenases. *J. Biochem.* 査読有、150 巻、2011、579-591

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.019

[学会発表](計 13 件)

古川那由太、戸川美里、宮永顕正、中島将博、田口速男、グラム陰性細菌 D 型乳酸脱水素酵素の機能・構造解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、川崎・明治大学

森田一弘、古川那由太、宮永顕正、中島将博、田口速男、*Tetragenococcus halophilus* 由来 D 型マンデル酸脱水素酵素ホモログの酵素学的性質、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、川崎・明治大学

古川 那由太、戸川 美里、宮永 顕正、中島 将博、田口 速男、グラム陰性細菌 D 型乳酸脱水素酵素におけるアロステリック調節の多様性、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜・パシフィコ横浜

古川那由太、戸川美里、宮永顕正、中島将博、田口速男、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 D 型乳酸脱水素酵素の機能-構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 13 日、鳥取・とりぎん文化会館

池原洋子、荒井一人、大野忠、古川那由太、宮永顕正、中島将博、田口速男、高度好熱性細菌 *Thermus caldophilus* 由来耐熱性アロステリック乳酸脱水素酵素の恒常的高活性化、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日、鳥取・とりぎん文化会館

田口速男、池原洋子、宗田亮輔、室井千尋、荒井一人、宮永顕正、中島将博、細菌アロステリック乳酸脱水素酵素の恒常的高活性化型酵素への変換、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、仙台・東北大学

古川那由太、戸川美里、中島将博、田口速男、グラム陰性菌由来アロステリック型 D-乳酸脱水素酵素の機能解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、仙台・東北大学

藤澤伸介、宮永顕正、古川那由太、荒井一人、中島将博、田口速男、*Enterococcus faecalis* IAM10071 由来 D 型マンデル酸脱水素酵素の構造解析、日本生化学会第 86 回大会、2012 年 12 月 15 日、福岡・福岡国際会議場・福岡マリンメッセ

宗田亮輔、野中真太、市川淳、片山正顕、荒井一人、宮永顕正、中島将博、田口速男、乳酸菌 *Lactobacillus casei* の L 型乳酸脱水素酵素のサブユニット間の変異導入による調節特性の改変、日本生化学会第 86 回大会、2012 年 12 月 15 日、福岡・福岡国際会議場・福岡マリンメッセ

池原洋子、藤井敦彦、三宅辰也、宮永顕正、荒井一人、中島将博、田口速男、好気性高度好熱菌 *Thermus caldophilus* 由来 L 型乳酸脱水素酵素のサブユニット間の変異導入によるアロステリック調節特性の改変、日本生化学会第 86 回大会、2012 年 12 月 15 日、福岡・福岡国際会議場・福岡マリンメッセ

古川 那由太、山田 美穂、折重 広大、市毛 朝雄、小山 泰二、藤田 信之、荒井 一人、宮永 顕正、中島 将博、田口 速男、醸造乳酸菌由来 L 型乳酸脱水素酵素の酵素学的解析、日本生化学会第 86 回大会、2012 年 12 月 14 日、福岡・福岡国際会議場・福岡マリンメッセ

折重広大、山田美穂、市毛朝雄、小山泰二、藤田信之、荒井一人、宮永顕正、田口速男、耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来の LDH の精製と性質、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都・京都女子大学

高橋葉、藤澤伸介、宮永顕正、田口速男、*Enterococcus* 属乳酸菌の D 型マンデル酸脱水素酵素の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都・京都女子大学

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田口 速男 (TAGUCHI, Hayao)  
東京理科大学・理工学部・教授  
研究者番号：90188136

##### (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：