

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570186

研究課題名(和文) 酵素の機能発現におけるキャビティーと水和の役割の解明

研究課題名(英文) Studies on the roles of cavity and hydration on the enzymatic function

研究代表者

大前 英司(OHMAE, Eiji)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30284152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システムを構築し、装置の性能を検証した結果、吸光度測定は十分に可能であったが、タンパク質内在性のトリプトファンによる蛍光測定はできなかった。本装置を用いて大腸菌ジドロ葉酸還元酵素(ecDHFR)の野生型とD27E変異体、および、深海微生物Moritella profunda DHFR(mpDHFR)の酵素化学的パラメーターの圧力依存性を測定した。その結果、ecDHFR野生型と比較してecDHFR D27E変異体とmpDHFRではKmの圧力依存性が小さく、活性部位周辺の溶媒への露出に伴う水和量の増加がDHFRの深海への適応に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-pressure stopped-flow absorbance / fluorescence spectrometer was set up to our laboratory. The absorbance and fluorescence spectra of fluorescein were sufficiently measured but the fluorescence spectrum of intrinsic tryptophan residues of a protein was not detected by this apparatus. We measured pressure dependences of the enzymatic kinetics parameters for the wild-type and D27E mutant dihydrofolate reductases from Escherichia coli (ecDHFR) and that from deep-sea bacterium Moritella profunda (mpDHFR). The obtained Km values for ecDHFR D27E mutant and mpDHFR were less pressure-dependent than that of the wild-type ecDHFR, suggesting that the hydration around active site is important for the adaptation of DHFR to deep-sea. The results of this study clarify the molecular adaptation mechanisms of proteins from deep-sea organisms to the high-pressure environment, and give a novel guideline for the alteration of enzymes to their utilization purposes such as high-pressure condition.

研究分野：生物学

キーワード：水和 高圧力 酵素

1. 研究開始当初の背景

圧力は、系の温度や成分を変えずに、蛋白質のダイナミクスや、蛋白質と蛋白質あるいは蛋白質とリガンドとの相互作用などを制御することができる唯一の方法である。加圧により系の体積は減少するため、蛋白質と他の蛋白質あるいはリガンドとの相互作用も、体積が減少する方向（一般には解離する方向）に変化する。また酵素反応も、基底状態と遷移状態との体積差（活性化体積、 ΔV^* ）が負の場合には加圧により促進され、活性化体積が正の場合には加圧により抑制される。

申請者はこれまでに、多くの深海微生物や近縁の常圧菌からジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) をクローニングして精製し、その構造や機能に対する圧力の効果を調べてきた (1, 2)。深海微生物 *Moritella profunda* 由来 DHFR (mpDHFR) と常圧菌である大腸菌由来 DHFR (ecDHFR) の立体構造はほとんど同じである (図 1) が、構造安定性や酵素機能の圧力依存性には大きな違いがある。



図 1. 大腸菌 DHFR (緑色、PDB code: 1rx2) と深海微生物 *M. profunda* 由来 DHFR (ピンク、2zza) の立体構造の比較

例えば ecDHFR は加圧により活性が低下するが、mpDHFR および深海微生物由来 DHFR の幾つかは加圧下の方が大気圧下よりも活性が増加し、高压環境に適応していると考えられた (図 2) [3]。しかし最近、常圧環境に生育する *Shewanella oneidensis* 由来 DHFR が耐圧性を示すこと (公表文献 1)、ecDHFR でもわずかにメチレン 1 個の挿入 (D27E) によって圧力依存性が反転し、耐圧性を示すようになること (図 2) が判明した [4]。これらの結果は、DHFR の酵素反応過程に於いて加圧によって反応速度が上昇する (ΔV^* が負の) 過程と低下する (ΔV^* が正の) 過程が含まれており、酵素反応全体の律速過程の位置によって見かけの圧力依存性が変化していることを示している。

野生型 ecDHFR の酵素反応過程は 5 つの素過程から構成されており、常圧下では生成物のテトラヒドロ葉酸が解離する過程が酵

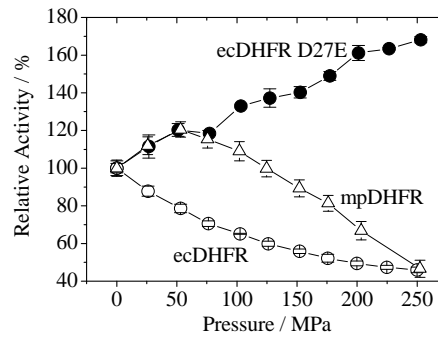


図 2. 大腸菌 DHFR 野生型 (○) と D27E 変異体 (●) および深海微生物 *M. profunda* 由来 DHFR (△) の酵素活性の圧力依存性

素反応全体の律速過程であることが知られている。しかしながら、mpDHFR や ecDHFR D27E 変異体の結晶構造は野生型 ecDHFR とほとんど同じであり、構造の違いから圧力応答の違いを引き起こすような律速過程の違いを説明することは困難である。一方、酵素反応過程においては、変性のような大きな立体構造の変化は起こらないと考えられることから、圧力応答の違いは、活性部位周辺のキャビティーと水和量の違いに由来していると考えられる。しかし、これらが酵素機能の発現において担っている役割に関しては、まだ全く研究されていない。

2. 研究の目的

本研究では、高压ストップフロー分光・蛍光測定により、ecDHFR 野生型と D27E 変異体および mpDHFR の酵素反応の各素過程を測定し、その反応速度の圧力依存性から活性化体積を算出する。得られた活性化体積から各素過程における基底状態と遷移状態間のキャビティーと水和量の変化を検討し、DHFR の酵素反応におけるキャビティーと水和の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高压ストップフロー分光・蛍光光度計システムの構築

本研究の実施に必要な高压ストップフロー装置は、名古屋大学理学研究科の高木秀夫准教授の御好意により、既に申請者の研究室に移設させていただいているが、加圧系と光学系が未整備なため、これらを設置して分光・蛍光光度計システムとする。

(2) 高压ストップフロー分光・蛍光光度計システムの性能検証

反応速度既知の幾つかの化学反応を測定することにより、高压ストップフロー分光・蛍光光度計システムの性能を検証する。

(3) DHFR のミカエリス定数および代謝回転数の圧力依存性の測定

ecDHFR の野生型と D27E 変異体および

mpDHFR の steady-state の酵素活性を 0.1 ~ 200MPa の圧力下で測定し、ミカエリス定数 (K_m) および代謝回転数 (k_{cat}) の圧力依存性を調べて、全体的な酵素機能の圧力依存性と変異の効果に関して検討する。

4. 研究成果

(1) 高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システムの構築

加圧系にテクノ環境機器製の高圧ハンドポンプとデジタル圧力計を設置した。また光学系に、ユニソク製キセノンランプ光源とシャッターコントローラーおよび StellarNet 社製 CCD 分光器とデータ取込み用 PC を設置し、光学フィルター、アイリス、光ファイバー、コリメーションレンズ等を使って光路構成した。さらに Thermo Fisher Scientific 社製の循環式恒温槽を設置して温度制御ができるようにして、高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システムを構築した(図3)。



図3. 構築した高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システム

(2) 高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システムの性能検証

構築した高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システムは、0.1 ~ 200MPa の圧力範囲、15 ~ 50 の温度範囲で問題なく動作したが、15 以下の低温領域では、セルの窓材やコリメーションレンズ表面への結露が見られた。15 以下での測定を行うには、窒素ガスか乾燥空気を流して結露を防止するシステムを取り付ける必要がある。

本装置による吸光度測定結果は安定性、再現性ともに高く、信頼性の高いデータが得られた(図4)。

しかしながら、蛍光測定は困難であった。これは蛍光物質から放出される蛍光を分光して検出する検出器であるため、各波長成分の光量が著しく低下してしまうことに由来している。このため、フルオレッセインのような量子収率の高い蛍光物質では測定可能であったが、当初の目的であったタンパク質内在性のトリプトファンでは蛍光測定ができなかった。検出器に光電子増倍管を用いてサンプルから放出される蛍光を分光せずに検出するようにすれば、本装置での蛍光測定

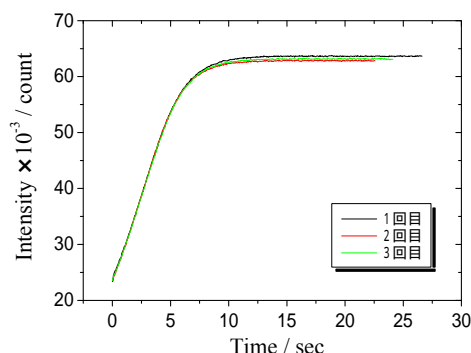


図4. 高圧ストップフロー分光・蛍光光度計システムによる吸光度測定再現性

も十分に可能だと考えられる。

(3) DHFR のミカエリス定数および代謝回転数の圧力依存性の測定

0.1 ~ 200MPa の圧力範囲で、ecDHFR の野生型と D27E 変異体、および mpDHFR の K_m と k_{cat} の測定を行った。どの DHFR でも K_m は加圧に伴って増加する傾向が見られ、加圧により基質との親和性低下することが示された。しかしながら、ecDHFR 野生型と比較して ecDHFR D27E 変異体と mpDHFR では K_m の圧力依存性が小さく、活性部位周辺の溶媒への露出度の上昇に伴う水和量の増加が DHFR の深海への適応に重要であることが示唆された。

一方 k_{cat} 値は、図2と同様の圧力依存性が見られ、過去の測定結果の妥当性が確認された。これらの結果は、深海生物由来タンパク質の高圧力環境適応メカニズムと、酵素の機能発現機構における水和の役割を明確にし、利用目的に応じた酵素の改変を行う際の新たな設計指針を与えるものである。

< 引用文献 >

C. Murakami, E. Ohmae, S. Tate, K. Gekko, K. Nakasone, and C. Kato, "Cloning and characterization of dihydrofolate reductases from deep-sea bacteria." *J. Biochem.* **147**, 591-595 (2010).

C. Murakami, E. Ohmae, S. Tate, K. Gekko, K. Nakasone, and C. Kato, "Comparative study on dihydrofolate reductases from *Shewanella* species living in deep-sea and ambient atmospheric-pressure environment." *Extremophiles* **15**, 165-175 (2011).

E. Ohmae, C. Murakami, S. Tate, K. Gekko, K. Hata, K. Akasaka, and C. Kato, "Pressure dependence of activity and stability of dihydrofolate reductases of the deep-sea bacterium *Moritella profunda* and *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 511-519 (2012).

E. Ohmae, Y. Miyashita, S. Tate, K. Gekko, S. Kitazawa, R. Kitahara, and K. Kuwajima,

“Solvent environments significantly affect the enzymatic function of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: Comparison of wild-type protein and active-site mutant D27E.” *Biocim. Biophys. Acta* **1834**, 2782-2794 (2013).

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 8 件)

S. Tanaka, E. Ohmae, and K. Matsuo, “VUVCD spectra of aromatic and aliphatic amino acids and their derivatives.” *HiSOR Activity Report* 2014, (2015) in press.

Y. Miyashita, E. Ohmae, K. Nakasone, and K. Katayanagi, “Effects of salt on the structure, stability, and function of a halophilic dihydrofolate reductase from a hyperhalophilic archaeon, *Haloarcula japonica* strain TR-1.” *Extremophiles* **19** (2), 479-493 (2015).

大前英司、宮下由里奈、月向邦彦、加藤千明「深海微生物由来ジヒドロ葉酸還元酵素の高圧力環境適応機構」第 18 回生物関連高圧研究会シンポジウム抄録集 (2015) in press.

E. Ohmae, S. Tanaka, K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, and K. Gekko, “Contributions of phenylalanine and tyrosine side chains to the vacuum-ultraviolet circular dichroism spectra of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase.” *HiSOR Activity Report* 2013, 138-139 (2014).

E. Ohmae, Y. Miyashita, and C. Kato, “Thermodynamic and functional characteristics of deep-sea enzymes revealed by pressure effects.” *Extremophiles* **17** (5), 701-709 (2013).

大前英司「タンパク質の構造安定性と機能における水和の役割 - 深海微生物由来酵素の研究からわかること - 」高圧力の科学 **23** 巻 1 号, 13-20 (2013).

E. Ohmae, Y. Miyashita, S. Tate, K. Gekko, S. Kitazawa, R. Kitahara, and K. Kuwajima, “Solvent environments significantly affect the enzymatic function of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: Comparison of wild-type protein and active-site mutant D27E.” *Biocim. Biophys. Acta* **1834** (12), 2782-2794 (2013).

E. Ohmae, K. Matsuo, and K. Gekko, “Vacuum-ultraviolet circular dichroism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: insight into the contribution of tryptophan residues.” *Chem. Phys. Lett.* **572**, 111-114 (2013).

[学会発表](計 2 4 件)

S. Tanaka, E. Ohmae, and K. Matsuo, “VUVCD spectra of aromatic and aliphatic amino acids and their derivatives.” *The 19th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation* (Mar. 5, 2015, Higashi-Hiroshima)

櫻井一正, 大前英司, 赤坂一之「1次元 NMR による深海菌ジヒドロ葉酸還元酵素の構造安定性の研究」第 55 回高圧討論会 (2014 年 11 月 23 日, 徳島)

西田直哉, 大前英司, 松木均「ホタルルシフェラーゼと吸入麻酔薬の相互作用様式の解明」第 55 回高圧討論会 (2014 年 11 月 22 日, 徳島)

大前英司, 田中傑, 宮下由里奈, 松尾光一「ジヒドロ葉酸還元酵素の真空紫外円二色性スペクトルに対する芳香族側鎖の寄与」特殊環境微生物セミナー2014 (2014 年 10 月 1 日, 名古屋)

宮下由里奈, 大前英司, 片柳克夫, 仲宗根薫「高度好塩性古細菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果」特殊環境微生物セミナー2014 (2014 年 10 月 1 日, 名古屋)

大前英司, 片柳克夫「結晶化タンパク質の円偏光二色性スペクトル測定」特殊環境微生物セミナー2014 (2014 年 10 月 1 日, 名古屋)

大前英司, 田中傑, 宮下由里奈, 松尾光一「ジヒドロ葉酸還元酵素の真空紫外円二色性スペクトルに対する芳香族側鎖の寄与」日本生物高分子学会 2014 (2014 年 9 月 12 日, 上田)

田中傑, 大前英司, 松尾光一, 月向邦彦「タンパク質の真空紫外円二色性スペクトルに対する芳香族側鎖の寄与」日本生物物理学会第 6 回中国四国支部大会 (2014 年 5 月 18 日, 鳥取)

宮下由里奈, 大前英司, 仲宗根薫, 片柳克夫「高度好塩性古細菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果」日本生物物理学会第 6 回中国四国支部大会 (2014 年 5 月 17 日, 鳥取)

大前英司, 宮下由里奈, 楯真一, 月向邦彦, 北沢創一郎, 北原 亮, 桑島邦博「ジヒドロ葉酸還元酵素の酵素機能に対する溶液条件の効果」日本生物高分子学会 2013 (2013 年 10 月 19 日, 大阪)

西田直哉, 大前英司, 楯真一「ジヒドロ葉酸還元酵素の構造及び安定性に対する水和とキャピテーの寄与」日本生物高分子学会 2013 (2013 年 10 月 19 日, 大阪)

宮下由里奈, 大前英司, 楯真一, 仲宗根薫「高度好塩性古細菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果」日本生物高分子学会 2013 (2013 年 10 月 19 日, 大阪)

大前英司, 宮下由里奈, 楯真一, 月向邦彦, 北沢創一郎, 北原亮, 桑島邦博「ジ

ヒドロ葉酸還元酵素の酵素機能に対する溶液条件の効果」特殊環境微生物セミナー2013 (2013年10月11日, 東広島)
西田直哉, 大前英司, 松木均「ホタルルシフェラーゼを用いた麻酔薬相互作用様式の解明」特殊環境微生物セミナー2013 (2013年10月11日, 東広島)
西田直哉, 大前英司, 楯真一「ジヒドロ葉酸還元酵素の構造及び安定性に対する水和とキャピテーの寄与」特殊環境微生物セミナー2013 (2013年10月11日, 東広島)

宮下由里奈, 大前英司, 楯真一, 仲宗根薫「高度好塩性古細菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果」特殊環境微生物セミナー2013 (2013年10月11日, 東広島)

大前英司, 宮下由里奈, 楯真一, 月向邦彦, 北沢創一郎, 北原亮, 桑島邦博「ジヒドロ葉酸還元酵素の酵素機能に対する溶液条件の効果」第18回生物関連高圧研究会シンポジウム (2013年9月6日, 岐阜)

西田直哉, 大前英司, 楯真一「ジヒドロ葉酸還元酵素の構造及び安定性に対する水和とキャピテーの寄与」日本生物物理学会第5回中国四国支部大会 (2013年5月26日, 岡山)

宮下由里奈, 大前英司, 楯真一, 仲宗根薫「高度好塩性古細菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果」日本生物物理学会第5回中国四国支部大会 (2013年5月26日, 岡山)

大前英司, 月向邦彦「タンパク質の等温圧縮率」特殊環境微生物セミナー2012 (2012年11月22日, 横浜)

- 21 日笠山聡, 大前英司, 月向邦彦, 楯真一, 仲宗根薫, 加藤千明「深海微生物由来タンパク質の構造安定性に対する水和の寄与」特殊環境微生物セミナー2012 (2012年11月22日, 横浜)

- 22 宮下由里奈, 大前英司, 楯真一, 仲宗根薫「高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* P2 DHFR の構造と機能に対する塩の効果」特殊環境微生物セミナー2012 (2012年11月22日, 横浜)

- 23 E. Ohmae, C. Murakami, S. Tate, K. Gekko, K. Nakasone, K. Hata, K. Akasaka, and C. Kato, "Thermodynamic and functional characteristics of deep-sea enzymes." *Seventh International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology* (Oct. 31, 2012, Otsu)

- 24 宮下由里奈, 大前英司, 楯真一「ジヒドロ葉酸還元酵素 42 位変異体の酵素機能に対する塩の効果」日本生物物理学会第4回中国四国支部大会 (2012年6月2日, 山口)

E. Ohmae, Y. Miyashita, and C. Kato, "Functional, structural, and thermodynamic characteristics of enzymes from deep-sea microorganisms." In: "Microbial Catalyst 2nd Ed." (Eds. S. M. Abdel-Aziz, N. Garg, A. Aeron, V. K. Gupta, C. K. Jha, and S. C. Nayak), Springer, (2015) in press.

E. Ohmae, K. Gekko, and C. Kato, "Environmental adaptation of dihydrofolate reductase from deep-sea bacteria." In: "High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers." (Eds. K. Akasaka and H. Matsuki), Springer, (2015) in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大前 英司 (OHMAE EIJI)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：30284152