

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658288

研究課題名(和文) 鉄硫黄クラスター含有架橋酵素の機能解析と新規環状生理活性ペプチドの創製

研究課題名(英文) Mechanism of FeS cluster-binding crosslink enzyme and production of novel cyclic peptide

研究代表者

岡島 俊英 (Okajima, Toshihide)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：10247968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素オペロンにコードされたORF2 タンパク質は、本酵素サブユニットにおいて酸性残基とCys残基の間に、3つの分子内チオエーテル架橋を形成し、5-8残基をループアウトした多環状構造を作り出す。このORF2タンパク質の機能解明と環状ペプチドライブラリーの構築を行うため、嫌気条件下において、同タンパク質を精製し、鉄硫黄クラスターを再構成することによって活性フォームを得ることに成功した。さらにモデル構造に基づいて、詳細な反応機構を明らかにした。また、架橋形成が1箇所になるように短縮したサブユニットにおいて、ランダム化を含む各種配列を導入する方法論を確立した。

研究成果の概要(英文)：An operon coding quinohemoprotein amine dehydrogenase (QHNDH) contains an ORF2 protein that generates three intra-peptidyl thioether crosslinks between Cys and Asp/Glu residues in the gamma subunit of QHNDH. As a result, 5-8 residues of loop regions were formed in the multi-loop structure of the gamma subunit. To elucidate the reaction mechanism of the protein and to construct peptide library cyclized by thioether bond formation, the ORF2 protein was purified under anaerobic conditions. Reconstitution of FeS cluster provided the active form catalyzing thioether bond formation in vitro. On the basis of the homology model of the ORF2 complexed with the gamma subunit, the details of the reaction mechanism were revealed in this study. In the short type gamma subunit containing a single crosslink site, it is successful that various sequences as well as randomized sites are introduced to the loop region.

研究分野：生化学

キーワード：鉄硫黄クラスター チオエーテル架橋 環状ペプチド

1. 研究開始当初の背景

高等動物から細菌にいたるまで、生物は様々な生理活性を有する低分子ペプチドを生産している。翻訳後修飾や非リボソーム合成系によって作り出された多様なペプチドのうち、ジスルフィド結合、チオエーテル架橋、あるいは head-to-tail 型のペプチド結合による環状構造をもつものは少なくない。環状化は、ペプチドの安定性に寄与し、構造を固定化することによって機能性を付与していると推測される。例えば、コノトキシンは、イモガイで作られる動物イオンチャンネルの阻害剤であり強力な神経毒であるが、その実体は 1-3 個のジスルフィド結合を有する 11-30 残基の環状ペプチドである (*Annu.Rev.Biochem.*,1999,**68**,59)。ナイシンなどランチビオティクスは、乳酸菌に由来する 31-34 残基の多環抗菌ペプチドであり、チオエーテル結合による架橋構造を有している (*Nat.Biotechnol.*,2006,**24**,1543) (図 1)。生理活性環状ペプチドの探索と生合成機構の解明の試みは、Walsh 教授 (米国ハーバード大学) のグループをはじめ国内外の研究者によって精力的に行われているものの (*Science* 2004,**303**,1805)、人工的に同様な環状ペプチドを作り出そうという試みはまだ始まったばかりであり、ほとんどなされていない (*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,2011,**108**,11052)。

2. 研究の目的

このような状況の中、本申請研究では新規な環状ペプチドのライブラリーの構築手法として、これまで我々が研究を進めてきたラジカル SAM タンパク質、ORF2 タンパク質 (投稿論文においては、QhpD と命名したが、ここでは ORF2 の名称を引き続き使用) を応用することを計画している (*J.Biol.Chem.*, 2006,**281**,13672)。ラジカル SAM スーパーファミリーに属する多くのタンパク質は、SAM に由来するアデノシルラジカルを用いて、各種の難化学反応を触媒することが知られている。ORF2 タンパク質は、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) のオペロン内にコードされ (*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2001, **98**, 14268, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 2830)、QHNDH の最も小さな γ サブユニット (投稿論文においては、QhpC と命名) の翻訳後修飾に関与している。Glu/Asp 残基と Cys 残基の側鎖間に化学的に安定なチオエーテル結合を 3 カ所で形成し、5-8 残基をループアウトした多環状構造を作り出す (図 1)。生合成機構とその機能は全く異なるが、 γ サブユニットの構造は、同じチオエーテル架橋を有する上述のナイシンとも類似している。

本研究では、研究期間内に、この新規なペプチド架橋酵素の反応メカニズムを解明するとともに、ORF2 タンパク質を用いて、環状ペプチドライブラリーを構築する方法を開発することを目的とする。すなわち、QHNDH の γ サブユニットではループアウト

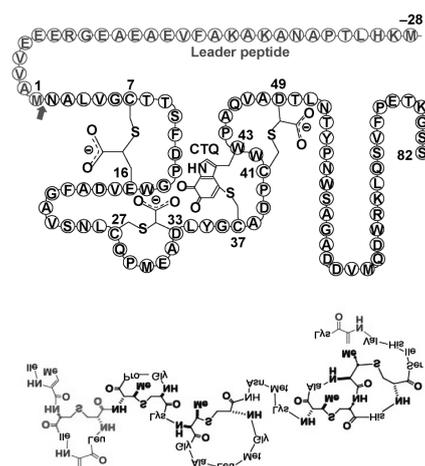


図 1. QHNDH γ サブユニット (上) とナイシン (下) の構造

した配列においてアミノ酸置換を許容できることを利用し、ランダム化ペプチドライブラリーを、ORF2 によって環状化する。構築されたライブラリーの有効性を示すため、HIV プロテアーゼなどへの阻害活性を有する環状ペプチドの試験的なスクリーニングを行うことも視野に入れたい。環状化ペプチド骨格は、遺伝子レベルにおけるランダム化も容易であり、極めて有望な創薬の基盤となる可能性がある。単なる抗菌化合物ばかりでなく、HIV プロテアーゼ阻害剤、コノトキシンのような極めて強力なリガンドなどを作り出せる可能性があり、それらは創薬におけるリード化合物となりうる。本研究は、ユニークなペプチドコンビナトリアルケミストリーの一分野を立ち上げる第一歩となるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 各種 ORF2 クローンの選択

研究代表者らは、これまでに *Paracoccus denitrificans* 由来の ORF2 タンパク質を用いて、発現系の構築やその機能解析を進めてきたが、ペプチドライブラリーの構築に用いる上で必ずしもこれがベストであるかは判断できない。そこで、ゲノム配列上で QHNDH オペロンの存在が判明している菌種 (*Pseudomonas putida* など) のいくつかにおいて、ゲノム DNA からの PCR によって遺伝子を増幅するか、オリゴヌクレオチドの連結した合成遺伝子を作製することによって、大腸菌発現系を構築する。発現量および鉄硫黄クラスター含量から判断して優れているものを選択する。反応性については、*in vitro* 反応系を構築することによって検討する。

(2) ORF2 タンパク質/ γ サブユニット複合体の精製と *in vitro* 反応系の構築

上記で選択した複数の菌種由来の ORF2 タンパク質において、*in vitro* 反応系を構築し、反応性を評価する。すなわち、対応する菌種の γ サブユニットにおいて、リーダー配列か

ら1つめのループ構造(短縮型 γ サブユニット)を含む発現ベクターを構築し、ORF2タンパク質と共発現させる。翻訳後修飾が完了した γ サブユニットには存在しないリーダー配列は、ORF2との結合に必須であり、これがないとチオエーテル架橋が形成されないことが、すでに判明している。そのため、 γ サブユニットの部分配列には、リーダー配列が付加されている。また、あらかじめHis-tagを付加しておくことによって精製を容易にした。ORF2タンパク質と γ サブユニットは複合体を形成しており、鉄硫黄クラスターを再構成させて用いた。チオエーテル架橋形成反応は嫌気条件下、ORF2タンパク質と γ サブユニット混合物にS-アデノシルメチオンとジチオナイトを添加してインキュベートすることによって行った。MALDI-TOF Massによる高分解能質量分析を用いて、精製されたペプチドにチオエーテル結合が形成されているかどうかを調べる。チオエーテル結合の形成量から最適なORF2タンパク質のクローンを選択する。

(3) 環状化ペプチドライブラリーの構築

環状化ペプチドライブラリーの構築については、まずPCRなどの方法によって、様々なループ配列をもつ短縮型 γ サブユニット遺伝子断片を作成した。この際、ループ領域にプロテアーゼ認識配列、およびランダム部位(コドン:NN(GC))などを導入した。さらに短縮型 γ サブユニット発現プラスミド上の対応領域を入れ替えることによって完成させた。

(4) ORF2構造予測と反応機構解析

結晶構造解析あるいは計算科学による構造予測を含め、ORF2タンパク質の反応機構の解析を詳細に行う。将来的に、許容できるアミノ酸残基を増やすためには、詳細な反応機構の理解に加え、基質ポケットの構造情報も有効である。すなわち、結晶構造に基づいた変異導入を行い、基質ポケットのサイズを大きくすることが可能となる。反応機構解析に関しては、ORF2の鉄硫黄クラスター結合残基、SAM結合部位、あるいは γ サブユニット認識部位に変異導入した。試験管内における反応系を用い、その影響を鉄硫黄クラスター含量、SAM分解活性、架橋形成活性などから評価した。

4. 研究成果

(1) ORF2タンパク質の機能解析

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素(QHNDH)オペロンにコードされたORF2タンパク質は、QHNDHの γ サブユニットにおいて酸性残基とCys残基の間に分子内チオエーテル架橋を形成し、5-8残基がループアウトした多環状構造を作り出す。まず*Pa. denitrificans*由来ORF2を用いて、その機能解析を行った。野生型および変異型ORF2の鉄

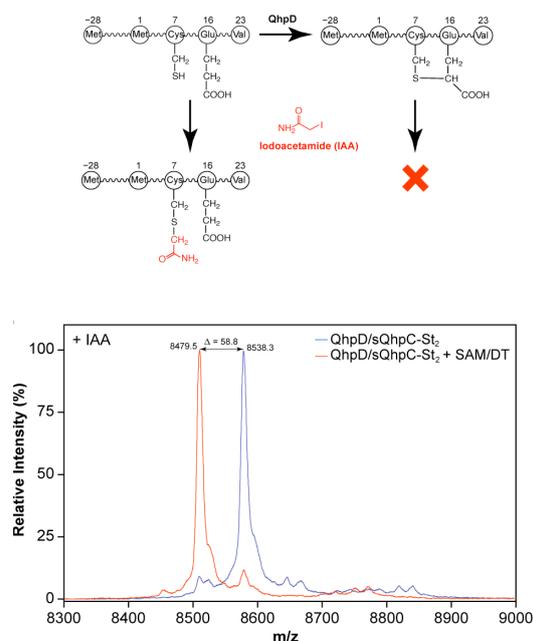


図2. 架橋形成された短縮型 γ サブユニット(IAA処理)のMassスペクトル

および硫黄含量の定量や分光学的解析の結果、3つの[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターが含まれていることがわかった(論文②)。ただ、精製したままの状態では、鉄硫黄クラスターの個数は約2個であり、部分的に分解していることがわかった。3つの[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターをもつORF2を得るために、試験管内で鉄硫黄クラスターを再構成する必要があった。再構成後に、嫌気条件下、試験管内でS-アデノシルメチオンとジチオナイトを混合することによって、架橋形成とSAM分解反応を引き起こすことに成功した(論文②)。得られた反応物は、2-ヨードアセトアミドで処理し、未架橋のCys残基を修飾した。これによって、架橋形成された場合と未架橋の場合の質量差が増大し、Mass解析による検出が容易となった(図2)。

変異型酵素の解析の結果、3つの[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターうち、N末端側に存在する鉄硫黄クラスターが、SAMの還元的分解に関与していることが判明した。また、基質となる γ サブユニットの架橋形成部位に存在するAsp/Glu残基を、負電荷を持たないAsn/Gln残基に改変すると、架橋形成が起らなかった。

詳細な反応機構解析や基質認識の詳細を解明するために立体構造情報が必要であるが、ORF2の結晶化には成功しなかったため、ホモロジーモデリングによってORF2/ γ サブユニット複合体のモデル構造を構築した。

(図3)その結果、ループ領域を結合するポケットの構成残基が明らかとなった。このポケット内で保存されたArg373は、 γ サブユニットのAsp/Glu残基の認識に機能していると推測され、Arg373をAlaに変換すると、変異型タンパク質では架橋形成が起らない実験結果とも合致した。架橋形成に関わる γ サブユニット上のもう一方の残基、Cys残基は、

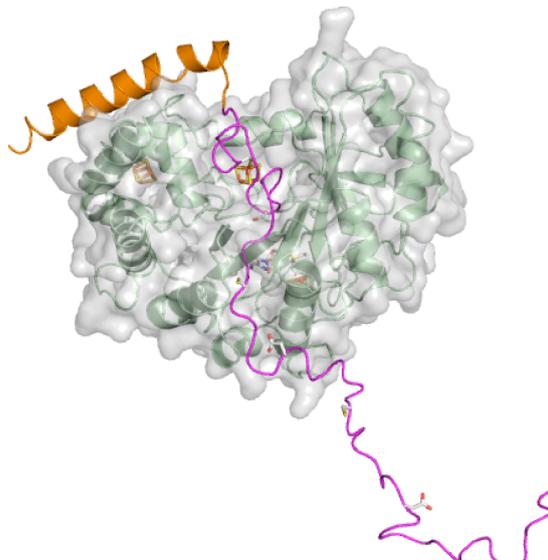


図 3. ORF2 (緑) と γ サブユニット (オレンジ、マゼンダ) の複合体モデル構造

N 末端側から 2 つめの [4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターが結合に関与すると予測された。興味深いことに、 γ サブユニットの 3 つの架橋形成部位への変異導入実験の結果、 γ サブユニットの N 末端から C 末端へ、連続的かつ順不同に架橋形成されていることがわかった (論文②)。以上の結果に基づいて生成したアデノシルラジカルが架橋形成に関わる反応機構を想定することができた。

(2) 各種 ORF2 の発現

細菌ゲノム配列データベースを、*Pa. denitrificans* γ サブユニット配列を用いて、ホモロジー検索を行った結果、多くのグラム陰性細菌ならびにごく少数のグラム陽性細菌から QHNDH をコードするオペロン (*qhp* オペロンと命名) が見出された (論文①)。見つかったすべての菌種において、ORF2 と γ サブユニットをコードする遺伝子が連続して存在することがわかった。そこで、架橋形成に適した ORF2 クローンを選択するため、*Pa. denitrificans* に加え、*Ps. putida*, *Polymorphum gilvum*, *Geobacillus thermoglucosidans* において、ORF2 単独ならびに γ サブユニットとの共発現を行った (後ろ 2 種は生育可能温度が高温)。その結果、*Pa. denitrificans* と同様に、*Ps. putida* では ORF2 単独ではほとんど発現しないものの、共発現によって、ORF2 と γ サブユニット複合体を著量発現させることができた。*Po. gilvum* では γ サブユニットの発現が著しく低いことがわかった。また、*G. thermoglucosidans* ORF2 では、単独ならびに γ サブユニットとの共発現いずれでも高い発現量を示した。しかし、いずれの場合においても大腸菌内で γ サブユニットの架橋形成は全体のせいぜい 10% 程度であった。そこで、*Pa. denitrificans* ORF2/ γ サブユニット共発現系に、さらに SAM 合成酵素遺伝子 (*MetK*) を導入することによって架橋形成量が増大するかどうか試みたところ、

架橋形成量が 26% まで増加させることに成功した (論文②)。すなわち、*in vivo* スクリーニングを行うためには、少なくとも *MetK* 遺伝子の導入によって、細胞内の SAM 濃度を上昇させることが有効であることがわかった。また、興味深いことに、*G. thermoglucosidans* の γ サブユニットには、他の菌種とは異なり、4 箇所の架橋形成部位が存在しており、同菌 ORF2 の作用によって、それが実際に架橋されることが生成物の Mass 解析によって明らかとなった。高熱菌 *G. thermoglucosidans* ORF2 は単独で著量の発現が可能でありライブラリー構築に有利な点もあるが、鉄硫黄クラスター再構成後に沈殿形成しやすく安定性に問題があった。現時点では、架橋ペプチドライブラリーの構築には、*Pa. denitrificans* 由来の ORF2 と γ サブユニット (短縮型等の改変型を含む) を用いるのが適していると結論できた。

(3) ランダムライブラリーの構築

短縮型 γ サブユニットのランダム化を含む配列改変に関しては、1) 3 本のオリゴヌクレオチドを用いた PCR 連結法と 2) 2 本の長鎖オリゴヌクレオチドをアニールし、DNA 合成酵素によって間隙を合成して埋める 2 通りの方法を実施した。1) では、特にランダム化した場合に予定外の変異が導入されたのに対して、2) ではほぼ安定して予定通りの各種配列をもつ短縮型 γ サブユニットを構築することができた。

以上のように、鉄硫黄クラスターの再構成を行えば、十分な架橋活性をもつ ORF2 タンパク質を得られるので、試験管内におけるプロテアーゼ阻害活性を有する環状ペプチドの試験的なスクリーニングを行うことが可能となった。架橋ランダム化ペプチドライブラリーは、様々な機能性を付与できる可能性があり、ペプチドのコンビナトリアルケミストリーを進展させる重要な成果といえる。

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)

- ① Tadashi Nakai, Hiroto Ito, Kazuo Kobayashi, Yasuhiro Takahashi, Hiroshi Hori, Motonari Tsubaki, Katsuyuki Tanizawa, and Toshihide Okajima, The radical S-adenosyl-L-methionine enzyme QhpD catalyzes sequential formation of intra-protein sulfur-to-methylene carbon thioether bonds. *J. Biol. Chem.* 査読有り, 290(17), 2015, 11144-11166.
- ② Tadashi Nakai, Takafumi Deguchi, Ivo Frébort, Katsuyuki Tanizawa, and Toshihide Okajima, Identification of Genes Essential for the

Biogenesis of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase. *Biochemistry* 査読有り, 53(5), 2014, 895-907.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 岡島 俊英、中井 忠志、出口 貴文、谷澤 克行、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 γ サブユニットの多段階翻訳後修飾機構、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日～27 日、横浜
- ② 中井 忠志、出口 貴文、谷澤 克行、岡島 俊英、多段階翻訳後修飾および膜輸送を伴うキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成プロセス、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～18 日、京都
- ③ Tadashi Nakai, Takafumi Deguchi, Katsuyuki Tanizawa, and Toshihide Okajima, Complete journey of quinohemoprotein amine dehydrogenase from genes to periplasm. The 4th International conference on cofactor (ICC-04), August 25-28, 2014, Parma, Italy
- ④ 中井 忠志、伊藤 寛人、岡島 俊英、小林 一雄、高橋 康弘、堀 洋、鏝木 基成、谷澤 克行、ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素によるマルチサイト架橋形成反応の解析、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、横浜
- ⑤ Hiroto, Ito, Tadashi Nakai, Toshihide Okajima, Kazuo Kobayashi, Yasuhiro Takahashi, Hiroshi Hori, Motonari Tsubaki, Katsuyuki Tanizawa, Functional Analysis of Intra-peptide Thioether Forming Enzyme Essential for Biogenesis of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase. 16th SANKEN International Symposium, January 22-23, 2013, Osaka, Japan
- ⑥ 中井 忠志、伊藤 寛人、岡島 俊英、小林 一雄、高橋 康弘、堀 洋、鏝木 基成、谷澤 克行、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に必須なペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素の機能解析。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 俊英 (OKAJIMA, Toshihide)

大阪大学産業科学研究所

研究者番号：10247968