

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450131

研究課題名(和文) 構造情報を基盤としたFMN結合反応の多重解析と分子進化的考察

研究課題名(英文) Multiple analysis of FMN-binding reaction and consideration on molecular evolution based on structural information

研究代表者

北村 昌也 (KITAMURA, Masaya)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20244634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：FMN結合タンパク質(FMN-bp)における補因子との結合反応解析を行った。補因子との結合強度は、蛍光法に加えて、表面プラズモン共鳴法および等温滴定型熱量測定法により、熱力学的に解析した。補因子との解離定数はリン酸イオン濃度には影響されなかった。アポタンパク質の調製法を変更することにより、結合活性を有するアポFMN-bpを大量に得ることができるようになり、その立体構造を決定できた。これらの結果を他のフラボタンパク質と比較し、アポFMN-bpとFMNの結合機構について、新たな提案を行った。

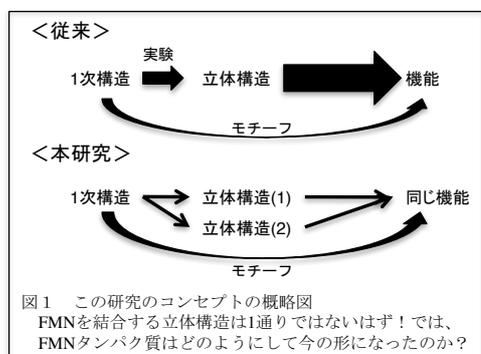
研究成果の概要(英文)：Binding reaction analysis with cofactor in FMN-binding protein (FMN-bp) was performed. Binding strength with cofactor was thermodynamically analyzed by the surface plasmon resonance spectroscopy and isotherm titration calorimetry in addition to the fluorescence spectroscopy. The dissociation constant with cofactor was not affected by the phosphate ion concentration. By changing the preparation method of apoprotein, I could obtain a large amount of apoFMN-bp having binding activity, and determined the three-dimensional structure. These results were compared with other flavoproteins and new proposals were suggested on the binding mechanism of apoFMN-bp and FMN.

研究分野：分子生物学

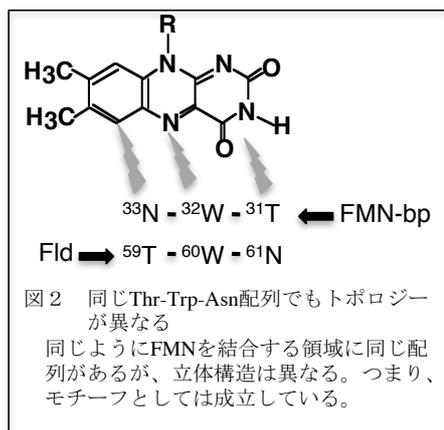
キーワード：フラボタンパク質 タンパク質工学 構造機能相関 補因子 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

ゲノム生物学の進展により、現在、膨大な数の遺伝子産物の1次構造が明らかにされている。その情報を機能と関連付けることは、タンパク質工学における究極の目標の1つであるが、その目標に向かうアプローチとして、その遺伝子産物を実際に手に入れ、立体構造解析を行い、立体構造情報を機能と結びつけるという方法が一般的である。しかし、これは、基質結合部位や触媒部位が立体的には保存されているという考えが根底にあり、1次構造が異なっても、同じ機能を持つタンパク質であれば立体構造は似ている、と考えられている。この研究では、フラビンモノヌクレオチド(FMN)タンパク質を取り上げ、FMNを結合することが機能であると定義した上で、少なくともFMNを結合する立体構造は1通りではないから、他にもFMNを結合する構造に至る道筋があるのではないかと、という仮説を立てた(図1)。



1992年福山らにより、フラボドキシニン(F1d)において、ある程度保存された1次構造、すなわちFMN結合モチーフが提案されている⁽¹⁾。この結合モチーフの中に、イソアロキサジン環と相互作用する配列として、⁵⁵⁻⁵⁷Thr-Trp-Asnがある。一方、FMN結合タンパク質(FMN-bp)にも³¹Thr-Trp-Asnがあり、立体構造を解析したところ、確かにイソアロキサジン環と相互作用していたが、その相互作用の様式は、福山らの提案とは異なっていた(概念図を図2に示した)。そこで、論文としては、FMN-bpの立体構造から進化的考察を加え、FMN-bpからセリンプロテアーゼへ進化する道筋を提案した⁽²⁾。



そこで、この概念をさらに発展させ、FMNタンパク質は、生命発生の初期にできたFMNを酸化還元中心に使うため、まず、これを取り囲むようにペプチド鎖がアレンジされ(これが1通りではなかったのではないかと)、その後、適当な酸化還元電位を持ち、また、酸化還元パートナーと相互作用できる分子へと進化していった結果、たまたまThr-Trp-Asnという配列に集束したと考えた。そこで、この初期に起こった「アレンジ」の後、最終的にTWNという配列に集束する間に何が起こったのか、すなわち、アミノ酸配列が進化していく過程でFMNとの結合反応は、物理化学的にはどのような違いがあったのだろうか。この研究では、これを解明することを当初の目標とした。

しかし、研究材料であるFMN-bpをアポ化の際に酸を加えていたが、この調製法には問題があった。すなわち、酸による変性が強すぎるためか、FMN結合能を失ったタンパク質が大量に存在する一方で、結合能を持つものと分離ができないという問題である。また、これを用いた蛍光法による解離定数(K_D)の決定では、値のばらつきが大きく、統計的な処理が、正しい結論に導いているか、確信が持てなかった。

一方で、タンパク質の結晶化については、多くの経験を積んできたので、どのように進めれば良いか、自信を持って取り組めるようになっていた。

2. 研究の目的

そこで、この研究では、補因子としてFMNを取り上げ、FMNとアポタンパク質の結合について、1次構造の共通性はあっても、FMNとアポタンパク質との結合様式が異なっているFMNタンパク質とF1dを主に取り上げることとした。これらはFMNを結合するという点では同じであるが、これらの進化の過程は異なっていたのではないかとこの道筋を、FMNとの結合という面を詳細に解析することにより違いを明らかにしようとした。すなわち、「FMNとアポタンパク質の結合反応を1つの熱力学的過程として捉え、分子進化の過程でどのようなことが起こってある配列に集束したのか?」という問題について、高次構造を基盤とした解析を行い、FMNタンパク質の進化的な成り立ちを明らかにすることを目標とした。

具体的な目的として、アポFMN-bpとFMNとの結合の物理化学的解析を多元的に行うこと、変異体FMN-bpを用いた解析を行い野生型と比較することにより、各残基の結合反応に対する寄与を明らかにすること、F1dの立体構造解析と他のF1dとの比較、さらにFMN-bpとF1dの比較、フラボドキシニン(F1r)といった他のFMNタンパク質との比較によって「FMNを結合するということはどういうことなのか」を明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

FMN-bp, F1d, F1r, 及びそれらの変異体は遺伝子工学的な方法を用いて得ることとした^{(3), (4)}。なお, F1dについては, 新たに緑膿菌由来のF1dを研究対象とした。遺伝子の変異導入には, クイックチェンジ法を用いた。各タンパク質をアポ化する方法として, トリクロロ酢酸を用いる方法とグアニジン塩酸を用いる方法を用いた。すなわち, フラボタンパク質は酸性条件下でフラビン誘導体を解離する性質を利用して, 10%トリクロロ酢酸溶液を用いて変性させた後, アポタンパク質を沈澱画分として分離し, ジエチルエーテルを用いて十分にトリクロロ酢酸を除いた後, 緩衝液に溶解させる事によりアポタンパク質を得ていた。しかし, 特に変異体タンパク質の場合, 多くが不溶化したり, FMN結合能を失ったりしていた。そこで, 変性剤としてグアニジン塩酸を用いて, より温和な条件下でアポ化しグアニジン塩酸を徐々に除いていくことにより再生させる条件を検討した。

各アポタンパク質とFMNないしリボフラビンとの結合反応の K_d の決定には, 蛍光滴定法に加えて, 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法, 等温滴定型熱量測定 (ITC) 法を用いた。X線結晶構造解析法により, 各タンパク質の立体構造を決めた。

4. 研究成果

FMN-bp, F1d及びF1rの変異体の作成を行った。具体的には, FMN-bpに存在する³¹Thr-Trp-Asn配列について, T31S, T31V, W32G, W32Y, W32A, W32F, W32H, N33Q, 及びN33Dの変異体遺伝子を取得できた。さらに, FMNのリン酸基と相互作用をしているH27やT54を変異させたH27A, H27K, H27R, T54A, T54K, T54Rの各変異体遺伝子を取得できた。その後, これらを発現ベクターに組み込み, 変異タンパク質の発現を確認した。F1d及びF1rについても同様である。定法に従って, 野生型及び変異タンパク質を精製した後, 補因子との結合強度を測定した。

まず, FMN-bp, F1d及びF1rの蛍光滴定法による K_d の測定を行った。これに関しては, アポタンパク質の調製法が最大の課題であったが, グアニジン塩酸法を用いることで, ほとんどすべてFMN結合能を有したアポタンパク質溶液として得られる事がわかった。そこで, このアポタンパク質を用いて, 蛍光滴定法により K_d の測定を行い, 十分に信頼のおけるデータを取得する事ができた。さらに, FMN-bp, F1d及びF1rのSPR法による K_d の測定を行った。これには, タンパク質の固定化や測定条件について十分な検討が必要であった。さらにFMN-bpのITC法による K_d の測定を行った。

また, FMNの結合に関して, イオン強度 (特にリン酸イオン濃度) の影響を調べた。野生型FMN-bpについて, リン酸イオン濃度を0mMから200mMとして蛍光滴定法により K_d を求めたところ, リン酸イオン濃度の上昇とともに

K_d も上昇することを見出した。また, Tris塩酸緩衝液系で硫酸イオン濃度を変化させた場合でも, 同様の傾向が見られた。一方で, SPR法を用いた場合, リン酸イオンの影響はあまり見られず, 硫酸イオンによる競合に関しても, 若干の影響が観察された程度であった。これらのことから, リン酸イオンや硫酸イオンによる影響は, F1dに見られるほど大きなものではなく, FMNの結合機構が異なっているのではないかと考えた。

緑膿菌由来のF1dについては, 野生型に加えて, F1dの2量体形成に重要なCys残基をAla及びSerに変異させた変異体の結晶を得, X線結晶構造解析を行った。これら2つの変異体の構造は変異体同士で非常によく似ていたが, 野生型F1dとは異なっていた。また, アポF1dの結晶を得, これもX線結晶構造解析を行った。これらの結果から, F1dのFMN結合機構に関して, 考察を行った。

FMN-bpのグアニジン塩酸を用いてアポ化すると, FMN結合能を有したアポFMN-bpを非常に効率よく, 大量に得られることがわかったので, アポFMN-bpの結晶を得, X線結晶構造解析により立体構造を決定した。

これらの結果から, FMN結合反応における官能基の認識順序が異なる新たな機構の提案を行った。

<引用文献>

- ① Fukuyama, K., Matsubara, H., and Rogers, L. J., Crystal structure of oxidized flavodoxin from red alga *Chondrus crispus* refined at 1.8 Å resolution: Description of the flavin mononucleotide binding site. *J. Mol. Biol.* **225**, 775-789 (1992)
- ② E. Liepinsh, M. Kitamura, T. Murakami, T. Nakaya, and G. Otting, Pathway of chymotrypsin evolution suggested by the structure of the FMN-binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F). *Nature Struct. Biol.* **4**, 975-979 (1997)
- ③ M. Kitamura, S. Kojima, K. Ogasawara, T. Nakaya, T. Sagara, K. Niki, K. Miura, H. Akutsu, and I. Kumagai, Novel FMN-binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) - Cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*-. *J. Biol. Chem.* **269**, 5566-5573 (1994)
- ④ N. Shibata, Y. Ueda, D. Takeuchi, Y. Haruyama, S. Kojima, J. Sato, Y. Niimura, M. Kitamura, and Y. Higuchi, Structure analysis of the flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F reveals key residues that discriminate the functions and properties of the flavin reductase family. *FEBS J.* **276**, 4840-4853 (2009)

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 7 件)

- ① Nadtanet Nunthaboot, Kiattisak Lugsanangarm, Arthit Nueangaudom, Somsak Pianwanit, Sirirat Kokpol, Fumio Tanaka, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan, Takeshi Nakanishi, and Masaya Kitamura, Photoinduced electron transfer from aromatic amino acids to the excited isoalloxazine in single mutated flavin mononucleotide binding proteins. Effect of the dimer formation on the rate and the electrostatic energy inside the proteins, *Comput. Theoretical Chem.* 査読有、**1108**, 1-9 (2017).
DOI: 10.1016/j.comptc.2017.03.005
- ② Yoshihiro Haruyama, Katsuyuki Kasai, Toshiki Yamada, Shukichi Tanaka, Yukihiro Tominari, Takahiro Kaji, Masaya Kitamura, and Akira Otomo, Development of UV light irradiation patterning of bacteriorhodopsin thin films for biomimetic functional devices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 査読有、**16**, 3420-3425 (2016).
DOI: 10.1166/jnn.2016.12308
- ③ Nadtanet Nunthaboot, Kiattisak Lugsanangarm, Arthit Nueangaudom, Somsak Pianwanit, Sirirat Kokpol, Fumio Tanaka, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan, Takeshi Nakanishi, and Masaya Kitamura, Photoinduced electron transfer from aromatic amino acids to the excited isoalloxazine in flavin mononucleotide binding protein. Is the rate in the inverted region of donor - acceptor distance not real? *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 査読有、**326**, 60-68 (2016).
DOI: 10.1166/jnn.2016.12308
- ④ Nadtanet Nunthaboot, Kiattisak Lugsanangarm, Somsak Pianwanit, Sirirat Kokpol, Fumio Tanaka, Takeshi Nakanishi, and Masaya Kitamura, Conformational difference between two subunits in flavin mononucleotide binding protein dimers from *Desulfovibrio vulgaris* (MF): Molecular dynamics simulation. *Comput. Biol. Chem.* 査読有、**64**, 113-125 (2016).
DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2016.05.007

- ⑤ Osaki Tomohiro, Fujisawa Shingo, Kitaguchi Masahiro, Kitamura Masaya, and Nakanishi Takeshi, Development of a bispecific antibody tetramerized through hetero-associating peptides. *FEBS J.* 査読有、**282**, 4389-4401 (2015).
DOI: 10.1111/febs.13505
- ⑥ Osaki Tomohiro, Cai-Xia Wang, Taro Tachibana, Masayuki Azuma, Kitamura Masaya, and Nakanishi Takeshi, Generation and characterization of rat monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 査読有、**34**, 418-422 (2015).
DOI: 10.1089/mab.2015.0034
- ⑦ Nadtanet Nunthaboot, Kiattisak Lugsanangarm, Somsak Pianwanit, Sirirat Kokpol, Fumio Tanaka, Seiji Taniguchi, Haik Chosrowjan, Takeshi Nakanishi, and Masaya Kitamura, Bell-shape dependence of the rate of ultrafast photoinduced electron transfer from aromatic amino acids to the excited flavin on the donor-acceptor distance in FMN binding proteins. *Computational and Theoretical Chem.* 査読有、**1030**, 9-16 (2014).
DOI: 10.1016/j.comptc.2013.12.014

[学会発表] (計 15 件)

- ①小田 真大、中西 猛、北村 昌也、FMN 結合タンパク質の補因子結合反応における FMN リン酸基の寄与、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ②多良 将吾、張 霜玉、中西 猛、北村 昌也、*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 由来 FMN 結合タンパク質の生産とその性質、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 7 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ③山口 亮、張 霜玉、高木 利佳子、中西 猛、北村 昌也、表面プラズモン共鳴法を用いた FMN 結合反応解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 7 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ④岡田 大規、荻野 公美子、中西 猛、北村 昌也、*Pseudomonas aeruginosa* 由来フラボドキシンの変異体の性質と構造、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 2 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

- ⑤Rikako Takagi, Takeshi Nakanishi, Takuma Maeda, Nobunari Satake, Kentaro Watanabe, Yoshitaka Moriwaki, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, and Masaya Kitamura, FMN-binding property and crystal structure of YviC from *Lactococcus lactis*, IUBM SYMPOSIUM 18th International Symposium on Flavins and Flavoproteins、2014年7月27日から8月1日、Phetchaburi(Thailand)

[図書] (計 1 件)

- ①石浦 章一、板部 洋之、高木 正道、中谷 一泰、水島 昇、横溝 岳彦 監訳、北村 昌也 他訳、西村書店、カラー生化学第4版、2015年、3-25

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bic/index-ie.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 昌也 (KITAMURA, Masaya)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20244634

(2) 研究分担者

中西 猛 (NAKANISHI, Takeshi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：20422074

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

津本 浩平 (TSUMOTO, Kouhei)