

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程入学

氏名 福田 英理子

指導教官 若木 高善

## 論文題目

*Sulfolobus* sp. strain 7 の 2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素に関する研究

2-オキソ酸を酸化的に脱炭酸してアシル-CoA を生成する反応は様々な代謝経路に関与しており、生物が生きる上で必須な反応である。ほとんどの生物では、この反応は 2-オキソ酸脱水素酵素複合体によって触媒されるが、それに対して全ての古細菌・一部の嫌気性生物では 2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (OFOR) によって触媒される。OFOR は補因子として 1 分子の TPP、1~3 個の[4Fe-4S]型クラスターを持ち、フェレドキシンを電子受容体として上記の反応を触媒する。OFOR ファミリーは基質とする 2-オキソ酸に対する特異性により 4 種類存在し、またそのサブユニット構造から abcd、ab、a 型などに分類される。各種 OFOR の一次構造の比較から、OFOR は 4 個の abcd 祖先型遺伝子の交換、欠失、融合を経て今日の形に分化したと考えられており、タンパク質の進化のモデルとして興味深い。OFOR を有する生物には病原性生物が多いことから、本酵素を標的とした阻害剤の設計も期待され、医薬的立場からも注目されている。

現在までに多くの OFOR ファミリーが様々な生物から単離され、またゲノム計画の進行に伴い、遺伝子配列からその存在が推定されている。しかし OFOR ファミリーは酸素に対して不安定なものが多く、遺伝子の組み換えによって得られるレコンピナ

ント OFOR も不安定であり、酵素の構造や機能に関する研究は限られたものであった。

本研究では、OFOR ファミリーの構造と機能を解明することを目指し、好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus* sp. strain 7 由来の OFOR (a, b サブユニットのヘテロダイマー) の大腸菌を用いた大量発現系を構築した。また、OFOR ファミリーにおいて保存性の高い YPITP モチーフの役割の解明、2-オキソ酸認識部位、CoA 結合部位の特定を試みた。

## 1. *Sulfolobus* sp. strain 7 の OFOR 遺伝子大量発現系の構築

*Sulfolobus* OFOR の遺伝子 *oforA*, *oforB* は 26 塩基の重複があるため、まずそれぞれ単独で大腸菌内で発現させ各サブユニットの機能解析を試みた。タンパク質のフォールディングを促進させるために大腸菌の GroESL を OFOR と共発現させ、また古細菌の Arg コドンは大腸菌のマイナーコドンであることを考慮して、tRNA<sup>Arg</sup> を補う遺伝子を導入したところ、両サブユニットの発現が確認されたが、a, b いずれのサブユニットも単独では OFOR 活性は示さなかった。次に、これらのサブユニットを別個の大腸菌内で発現させた後に、試験管内で混合して OFOR を再構成させる試みを行ったが、天然型酵素の約 1% 程度の OFOR 活性しか検出されなかった。それに対し、a, b サブユニットを同一の大腸菌内で発現させたところ、活性のあるレコンビナント OFOR を得ることができた。*Sulfolobus* sp. strain 7 から精製した天然型 OFOR と比較したところ、レコンビナント OFOR は比活性、至適温度、至適 pH、熱安定性など調べた全ての点で天然型と同一の性質を示した。

これらの結果より、OFOR の a, b サブユニットをコードする遺伝子 *oforA*, *oforB* は翻訳されるときに同一の菌体内に存在することが必要であり、正しい立体構造をとるために互いに相互作用している可能性が考えられる。

現在までに OFOR ファミリー酵素遺伝子の大腸菌を用いた発現系を構築した例がいくつか報告されているが、得られたレコンビナント OFOR はいずれも天然型 OFOR よりも不安定化しており、比活性も劣っていたことから、酵素本来の構造・機能を示していない可能性が高い。本研究で構築された *Sulfolobus* OFOR の発現系は、天然型 OFOR と同一の性質を有するレコンビナント OFOR を得た最初の例であると考えられる。

## 2. YPITP モチーフの役割

OFOR ファミリーは互いに一次構造の相同性が低く、鉄硫黄クラスター結合部位、TPP 結合部位などが部分的に保存されているが、その他のアミノ酸配列においては他

の構造・機能既知の酵素と相同性は認められない。しかし、*Sulfolobus* OFOR では a サブユニットに見出される 5 アミノ酸残基から成る YPITP モチーフ (第 253~257 残基) は OFOR ファミリーにおいて高く保存されており、また OFOR ファミリーに特有で機能は未知である。そこで、本モチーフの役割を調べることを目的として、先に確立された *Sulfolobus* OFOR の発現系を用いて YPITP モチーフに部位特異的変異を導入した。変異体の解析を行った結果、Y253 と P257 の変異体はいずれも活性が失われており、この位置におけるアミノ酸残基は活性に重要であると考えられる。Y253F はわずかな活性を示したことから、第 253 残基には芳香環が必須であることが明らかになった。P254, I255, T256 の変異体はいずれも野生型 OFOR よりも低い  $V_{max}$  値を示したが、2-オキソ酸に対する  $K_m$  値には重大な変化はなく活性は保持されていた。

近年、*Desulfovibrio africanus* 由来のピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (POR) の X線結晶構造が解明され、基質との複合体の 3Å 分解能の構造も得られたことから、ピルビン酸の結合様式について、YPITP モチーフは基質結合部位に隣接しており、モチーフの Thr 残基の水酸基はピルビン酸のカルボニル基と水素結合し、基質認識に重要であると提唱された。しかし、*Sulfolobus* OFOR の T256 の変異体 T256A 等はいずれも活性を保持しており、Thr 残基-基質間相互作用は必須ではないことが明らかになった。YPITP 変異体の各種 2-オキソ酸に対する  $V_{max}$  値は、いずれも野生型 OFOR の 50% 以下であったのに対して、 $K_m$  値は野生型 OFOR と大きな差は見られなかった。この結果から、YPITP モチーフは 2-オキソ酸の認識・結合ではなく、酵素の触媒反応に重要な役割を果たしていると考えられる。

### 3. OFOR の 2-オキソ酸認識部位

一般に OFOR ファミリーは基質特異性が高く、一種類の 2-オキソ酸しか基質としない。しかし、*Sulfolobus* OFOR は基質特異性が広く、ピルビン酸、2-オキソブチル酸、2-オキソグルタル酸など複数の 2-オキソ酸を基質とすることができる。そこで、*D. africanus* POR の立体構造と一次構造の比較に基づき、*Sulfolobus* OFOR の 2-オキソ酸結合に関与していると予想されるアミノ酸残基 (a サブユニットの T256, R344, T353, b サブユニットの K49, L123) に部位特異的変異を導入してその影響を調べた。変異体を解析した結果、R344 の変異体は活性を失っていたが、その他の変異体はいずれも活性を保持していた。R344 のグアニジノ基は 2-オキソ酸のカルボキシル基を認識すると推測されており、またこの位置における Arg 残基は OFOR ファミリーで完全に保存されていることから、本アミノ酸残基は基質結合に必須であると考えられる。T353 は

2-オキソ酸の側鎖に相当する部分と相互作用していると推測されているが、T353 の変異体は各種 2-オキソ酸に対する比活性が野生型 OFOR の 5%以下に低下しており、基質結合・酵素反応に重要であると考えられる。K49 と L123 は 2-オキソ酸の側鎖の認識に関与していると予想されている。K49 の変異体はピルビン酸に対する活性は保持されていたが、その他の 2-オキソ酸に対する活性が大きく低下しており、第 49 残基は OFOR をピルビン酸に特異的な POR 型酵素に決定づけるアミノ酸残基の一つであると考えられる。一方、L123 の変異体は 2-オキソグルタル酸に対する活性が保持されているのに対して、その他の 2-オキソ酸に対する活性が著しく低下しており、第 123 残基は OFOR を 2-オキソグルタル酸に特異的な KOR (2-オキソグルタル酸：フェレドキシン酸化還元酵素) 型酵素に決定づけるアミノ酸残基の一つであると考えられる。またこれらの結果は、本酵素の広い基質特異性は 2-オキソ酸の側鎖を認識する残基 T353, K49, L123 に起因すること、2-オキソ酸結合部位は両サブユニット界面にあることを示唆している。

#### 4. OFOR の CoA 結合部位

*D. africanus* POR の立体構造解明に伴い、2-オキソ酸、TPP 結合様式は明らかにされたが、もう一つの基質である CoA の結合部位は依然として未知である。そこで、*Sulfolobus* OFOR の CoA 結合部位と予想される配列 GXXGXXG (a サブユニットの第 9 ~14 残基) の Gly に部位特異的変異を導入し、変異体の解析を行ったところ、いずれの変異体もわずかな活性しか示さなかった。他方、アデニン類似体である 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F)を用いた共有結合修飾による OFOR の失活は CoA で保護されること、NBD-F は OFOR の b サブユニットに特異的に結合することから、CoA も a, b サブユニット界面に結合することが明らかになった。

本研究により、OFOR ファミリーのタンパク質工学的研究に適した遺伝子発現系が確立し、これに基づく各種変異体の解析から、OFOR ファミリーに特有の機能未知の保存配列 YPITP の役割について、また 2-オキソ酸に対する基質特異性を決定するアミノ酸残基、CoA 結合部位に関する新たな知見が得られた。これらの結果に基づき、医薬上有益である OFOR の阻害剤の設計や、任意の 2-オキソ酸を基質とする新たな改変 OFOR の設計などの可能性が期待される。