

氏 名 松原 永季

学位(専攻分野) 博士(学術)

学位記番号 総研大甲第 1952 号

学位授与の日付 平成29年9月28日

学位授与の要件 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 *Sphingobium* sp. SYK-6 株由来 Extradiol 型 2 原子酸素添加
酵素 DesZ の X 線結晶構造解析

論文審査委員 主 査 教授 足立 伸一
教授 千田 俊哉
准教授 加藤 龍一
准教授 川崎 政人
助教 山田 悠介
教授 政井 英司 長岡技術科学大学
教授 永田 裕二 東北大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

DesZ は活性中心にノンヘムの二価鉄を 1 つもつアミノ酸残基数 330、分子量 36,530 の TypeII-ClassIII Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素(ジオキシゲナーゼ)で、*Sphingobium* sp SYK-6 株のリグニン由来低分子芳香族化合物代謝経路において 3-*O*-methylgallate (3MGA) の芳香環開裂反応を触媒する。この菌株からは現在までに DesZ の他 LigZ、LigAB、DesB という基質特異性は異なるが同じ分類に属する芳香環開裂酵素が単離されており、それぞれ主に 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxy-biphenyl (OH-DDVA)、protocatechuate (PCA) および gallate を基質とした反応を触媒すること、これらの酵素反応で DesZ は比較的低い活性を示すことが知られている。また、LigAB および DesB については既に結晶構造が決定されている。これらの酵素のアミノ酸配列解析から、DesZ は LigAB および DesB が持つ活性中心の蓋にあたる領域を持たず、LigAB および DesB が持たない 2 箇所挿入配列 (33-66、126-136 残基) を持つことが分かった。また、これら酵素が属する Extradiol 型ジオキシゲナーゼの大多数では活性中心で 2 価の鉄イオンと配位結合する残基について His-His-Glu モチーフが保存されるが、DesZ ではこのモチーフに相当する 98 番目の残基の His は保存されておらず、Gln として存在していた。この解析結果と Swiss-model による DesZ の予測構造から、DesZ の活性中心で鉄イオンと配位する残基は His-Gln-Glu という新規モチーフを持つことが予想された。本研究では、DesZ と類縁酵素間の基質および金属イオンの結合様式の違いについて立体構造に基づいた知見を得ることを目的とし、DesZ の X 線結晶構造解析と、得られた結晶構造による基質複合体構造の予測に基づいた変異体群の活性比較による分析を行った。

DesZ は大腸菌を用いて大量発現、精製を行い、結晶化は活性中心の 2 価の鉄イオンが酸化により遊離するのを防ぐために精製直後に嫌気条件下で行った。回折データ測定はフォトンファクトリー PF-BL1A (茨城県つくば市) で行い、Native-SAD 法により位相を決定した。構造精密化は 1.85 Å 分解能で行った。得られた DesZ の構造は LigAB・DesB の活性中心を含むドメインと似た全体構造を示し、活性部位の蓋に相当する欠損領域については C 末端側の約 10 残基(残基番号 126-136)の挿入配列領域が部分的にそれを補填していた。また、活性中心で金属イオンに配位していた残基はアミノ酸配列分析による予想と異なり、His12-His184-Glu287 で構成された類縁酵素間で保存されるモチーフであった。しかし、異常分散を利用した解析から、得られた結晶構造の活性中心には DesZ が本来持つ鉄イオンではなくカルシウムイオンが結合していることが明らかになった。また、DesZ の活性測定結果において、鉄配位型では活性を示すが、カルシウムイオン配位型では活性が阻害されることから、本研究で得られた結晶構造はカルシウムが配位した不活性型の構造であることが分かった。そこで、ネイティブの状態の活性型 DesZ について分析するために、LigAB および DesB の基質複合体構造と本研究で得られた DesZ 構造の重ね合わせ比較から基質認識および金属配位に関与すると予測されるアミノ酸残基に変異を入れた DesZ 変異体を調製し、これらの活性測定を行った。この結果、Arg26、Arg315 を Ala もしくは Glu に置換した変異体では 3MGA の開裂触媒活性が消失することが明らかになり、これらの残基が 3MGA のカルボキシ基の認識に必須であると予測された。また、LigAB と DesB の触媒残

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

基である His195 および His19 はアミノ酸配列解析で DesZ の His250 に相当するが、これを Ala に置換した変異体では活性が消失したことから、DesZ においても His250 が触媒残基として機能する可能性が示唆された。DesZ 結晶構造において活性中心で金属と配位する残基 (His12-His184-Glu287) については、どれひとつを Ala に置換しても活性が消失する結果であった。また、DesZ の Gln98 が金属配位モチーフとして保存されていないことが DesZ の活性が低い原因である可能性を考慮し、Q98H 変異体を作成し、その構造解析 (2.55 Å 分解能) と活性の測定を行った。その結果、全体構造においては野生型と Q98H 変異型の違いは確認できなかった。しかし、Q98H 変異体では Chain B の His98 について側鎖の電子密度が明確ではなく、側鎖が不安定な状態であることが示唆された。加えて、Q98H 変異体では 3MGA に対する活性が野生型と比較して低下しており、この残基が His でないことが活性の低さの原因ではないことが明らかになった。

この Gln98 は DesZ と LigAB および DesB の一次構造配列解析、重ね合わせた立体構造の Ca 位置のいずれにおいても LigAB/DesB で鉄イオンに配位する残基である His61/His59 に対応し、3MGA のカルボキシ基を認識すると思われる Arg26/Arg315、触媒残基と予測される His250 の位置と LigAB および DesB の基質複合体構造との対応を考慮に入れるとネイティブ状態の活性型 DesZ で実際に鉄イオンと配位する残基は His12-Gln98-Glu287 である必要があるため、今回得られた DesZ 結晶構造の金属配位状態はカルシウムイオン配位型の不活性な状態であることによるものと考えられた。

また、ゲノム配列分析から、TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼには DesZ 同様の挿入配列を持ち、Arg26、Arg315 に対応する残基が保存されたサブグループが存在することが示唆された。このサブグループでは、これらの残基は基質と相互作用し、活性中心における基質の位置を安定させる役割を持つことが予測される。また、このサブグループはさらに a) DesZ および LigZ の Gln98 および Asn96 に相当するアミノ酸残基が保存され、His-Gln-Glu 金属配位モチーフを持つグループ、b) DesZ の Gln98 に相当するアミノ酸残基は His として保存されるが、DesZ で Asn96 に相当する残基が Ser として存在する His-His-Glu 金属配位モチーフを持つことが予測されるグループが存在することが判明した。

以上、本研究で決定した DesZ の X 線結晶構造および変異体の活性測定結果と、アミノ酸配列を用いたゲノム配列分析から、TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼには新規サブグループが存在し、DesZ および LigZ は金属配位モチーフがこれまで一般的に考えられてきた His-His-Glu ではなく、His-Gln-Glu という新規モチーフを持つサブグループに属することが明らかになった。

Summary of the results of the doctoral thesis screening

DesZ は活性中心にノンヘム型の二価鉄を 1 つ持つアミノ酸残基数 330、分子量 36,530 の TypeII-ClassIII Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素で、*Sphingobium* sp. SYK-6 株のリグニン由来低分子芳香族化合物代謝経路において 3-*O*-methylgallate (3MGA)の芳香環開裂反応を触媒する。この菌株からは現在までに DesZ の他 LigZ、LigAB、DesB という基質特異性は異なるが同じ TypeII-ClassIII Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素に属する芳香環開裂酵素が単離されており、それぞれ主に OH-DDVA (2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxy-biphenyl)、protocatechuate (PCA; 3,4-dihydroxybenzoate) および gallate (3,4,5-Trihydroxybenzoate) を基質とした反応を触媒すること、これらの酵素反応で DesZ は比較的低い触媒活性を示すことが知られている。また、LigAB および DesB については既に結晶構造が決定されている。これらの酵素のアミノ酸配列解析から DesZ は LigAB および DesB が持つ活性中心の蓋にあたる領域を持たず、LigAB および DesB が持たない 2 箇所の挿入配列を持つこと、これら酵素が属する Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素の大多数では活性中心で鉄イオンと配位結合するのは His-His-Glu モチーフであるが、DesZ では His-Gln-Glu モチーフである可能性が示唆されていた。本研究では、DesZ と類縁酵素間の基質および金属イオンの結合様式の違いについて結晶構造に基づいた知見を得ることを目的とした。

DesZ は大腸菌を用いた大量発現、精製により純度 94%程度まで精製し、結晶化は活性中心に含まれる 2 価の鉄イオンが酸化されて遊離するのを防ぐために精製直後に嫌気条件下で行った。嫌気条件下での実験は、無酸素チャンバーを用いて行った。回折データ測定は高エネルギー加速器研究機構の放射光実験施設であるフotonファクトリーの PF-BL1A で、波長 1.9Å の X 線を用いて行った。1.9Å の波長を用いたのは、タンパク質中の硫黄原子等からの異常分散シグナルを用いる Native-SAD 法により位相を計算し結晶構造を決定する為である。構造精密化は 1.85 Å 分解能で行った。得られた DesZ の構造は LigAB・DesB の活性中心を含むドメインと似た全体構造を示し、活性部位の蓋に相当する欠損領域については C 末端側の約 10 残基 (残基番号 126-136) の挿入配列領域が部分的にそれを補填していた。また、活性中心で金属イオンに配位していた残基はアミノ酸配列分析による予想とは異なり、His12-His184-Glu287 で構成されていた。異常分散を利用した解析や、金属イオンと配位子の間の配位距離の解析から、得られた結晶構造の活性中心には DesZ が本来持つ鉄イオンではなくカルシウムイオンが結合していることが強く示唆された。DesZ の活性測定結果において、鉄配位型では活性を示すが、カルシウムイオン配位型では活性が阻害されることから、本研究で得られた結晶構造はカルシウムが配位した不活性型の構造であることが明らかになった。そこで、ネイティブの状態の活性型 DesZ について分析するために、構造既知である LigAB および DesB の構造と本研究で得られた DesZ 構造の重ね合わせに基づき基質認識および金属配位に関与すると予測されるアミノ酸残基に変異を入れた DesZ 変異体を調製し活性測定を行った。活性測定は、触媒反応により消費される反応溶液中の酸素濃度を測定する方法で行った。比活性の算出は、酵素反応の初速を適切に評価することで行い、得られた比活性値は過去に得られていたデータと矛盾が無いことを

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

確認した。この解析結果と過去に解析された Extradiol 型二原子酸素添加酵素の触媒反応機構を参照することで、DesZ の活性中心で 2 価鉄イオンと配位しているのは、結晶構造とは異なった His12/Gln98/Glu287/Asn96 であること、触媒残基は His184 および His250 であることが強く示唆された。また、Arg26、Arg315 が基質のカルボキシル基の認識に関与していることも推測された。これらの結果を考慮に入れて種々のバクテリアのゲノム配列分析を行った結果、TypeII-ClassIII Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素には DesZ 同様の挿入配列を持ち、Arg26、Arg315 に対応する残基が保存されたサブグループが存在することが明らかになった。以上のことから、金属配位モチーフがこれまで一般的に考えられてきた His-His-Glu ではなく、His-Gln-Glu というモチーフを持つ二原子酸素添加酵素の新しいサブグループが存在し、DesZ はそのサブグループに属する酵素であることが強く示唆された。

本審査の発表では予備審査での指摘事項、(1)論文全体のストーリーを研究の流れや全体像が把握しやすい構成に変え、さらに序論を適切に構成し直すこと、(2)確立した活性評価系に関して過去のデータとの比較から検討を加え、過去のデータとの関連を明確にすること、(3)本酵素の遺伝子ファミリーに関する考察を加えること、(4)本研究による発見とその意義を明確にすること、の 4 点に適切に対応したことが示され、これらを反映した発表が行われた。質疑応答にも的確に答え、研究内容及び関連する分野に関する十分な知見があることを示した。論文の最後の部分の討論を理解しやすく構成し直すことを前提として、本審査委員会は全員一致で博士論文の本審査合格と判定した。