

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の 生合成に必須の奇妙なプロテアーゼ



若 者

中 井 忠 志*

An unusual protease essential for biogenesis of
quinoxemoprotein amine dehydrogenase

Key Words : posttranslational modification, processing protease, serpin

酵素の触媒機能を助ける補酵素の多くは、水溶性 B 群ビタミンなどから生合成された後、別途に合成された前駆体酵素タンパク質 (アポ酵素) に取り込まれる。しかし、このような遊離の低分子有機化合物の補酵素とは異なり、ペプチド鎖に直接結合したかたちで存在する一連の補酵素 (ビルトイン型補酵素と呼ぶ) が、1990 年代以降に、酸化還元酵素を始めとするさまざまな酵素中に相次いで発見されてきた。すなわち、銅アミン酸化酵素のトバキノン (TPQ) やガラクトース酸化酵素のチロシルチオエーテルなどに代表される新規な共有結合型補酵素である。ビルトイン型補酵素は、各酵素の遺伝子中では通常のアミノ酸残基あるいは翻訳終止コドンとしてコードされており、前駆体アミノ酸残基が何らかのタンパク質の翻訳後修飾を受けたり、終止コドンが特異的機構により新奇なアミノ酸として読み取られたりすることで、触媒反応に必須の補酵素に変換される。例えば、銅アミン酸化酵素の TPQ はチロシン残基として、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) のシステイントリプトフィルキノン (CTQ) はシステイン残基とトリプトファン残基としてそれぞれ翻訳された後、翻訳後修飾を受けて補酵素型に変換される (図 1)。筆者の所属する谷澤研究室では、これまでに細菌の銅アミン酸化酵素を用いて TPQ の銅イオン依存的な自己触媒的

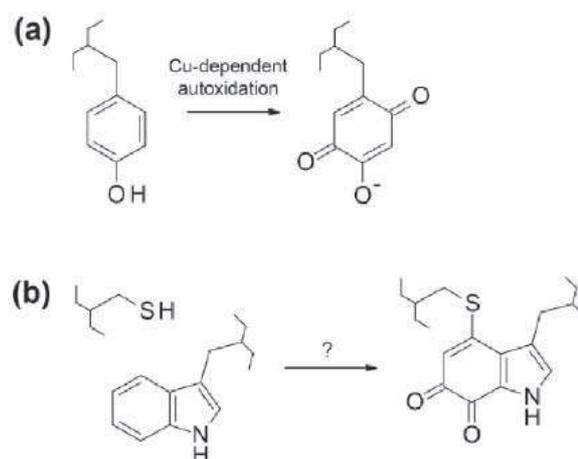


図 1. TPQ (a) および CTQ (b) の生合成

生成機構 (1) や TPQ 生成過程における活性部位の構造変化 (2) を世界に先駆けて明らかにしてきた。一方、CTQ を含有する QHNDH の生合成機構は極めて複雑で、CTQ の生成機構を含む QHNDH の生合成プロセスの詳細は未解明に残されている。筆者らは、QHNDH の CTQ 補酵素がタンパク質の翻訳後にどのような機構で生合成されるかを中心に、種々の生化学的、分子生物学的研究手法を駆使して QHNDH の生合成プロセスを明らかにすることを目指して研究を行っている。本稿では、QHNDH の生合成に関わる奇妙なプロテアーゼ (3) を中心に最近の研究成果を紹介する。

QHNDH は、グラム陰性細菌の *Pseudomonas putida* や *Paracoccus denitrificans* のペリプラズム画分に誘導生成する酵素で、 $\alpha\beta\gamma$ のヘテロ三量体サブユニット構造をもつ。約 60 kDa の α -サブユニットには 2 分子のヘム c が、約 9 kDa の γ -サブユニットに CTQ が含まれている (図 2)。さらに、 γ -サブユニット内の 3 個のシステイン残基はそれぞれ



*Tadashi NAKAI

1973年9月生
大阪市立大学大学院理学研究科化学専攻
後期博士課程修了 (2000年)
現在、大阪大学 産業科学研究所 生体
触媒科学研究分野 (谷澤研究室) 助教
博士 (理学) 生化学・構造生物学
TEL : 06-6879-8462
FAX : 06-6879-8462
E-mail : nakaix@sanken.osaka-u.ac.jp

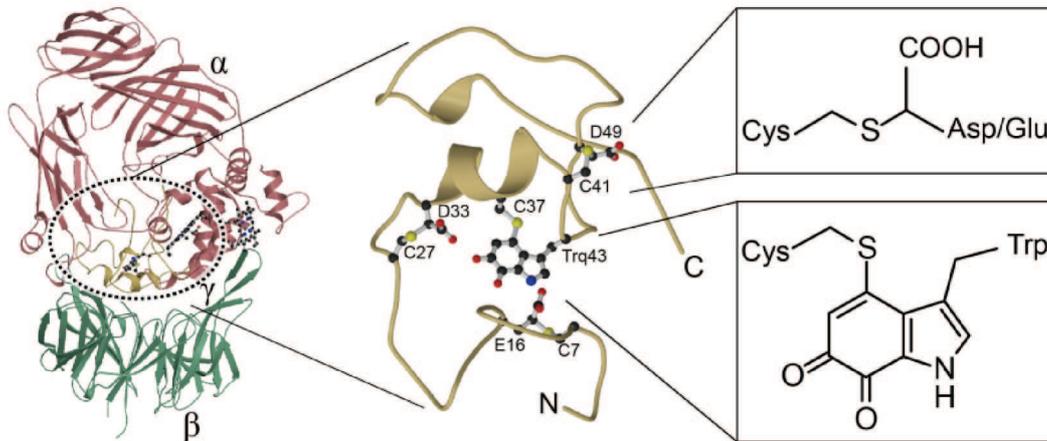


図2. QHNDHの立体構造と γ -サブユニットに存在する分子内チオエーテル架橋およびCTQ 補酵素

アスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基のメチレン炭素と分子内チオエーテル架橋構造を形成している(図2)。筆者らは、このように極めて複雑な構造をもつQHNDHの生合成機構の解明を目的として、本酵素サブユニット遺伝子を含むオペロン中の周辺遺伝子の役割を遺伝子破壊などの方法を用いて解析している。これまでに、 α -サブユニット遺伝子と γ -サブユニット遺伝子に挟まれてコードされ‘ラジカルSAMスーパーファミリー’に属する約55 kDaの鉄硫黄クラスター含有タンパク質(ORF2タンパク質)は、 γ -サブユニット内のチオエーテル架橋構造の形成に必須の役割を果たすことが明らかになっている(4)。また、ORF2遺伝子を破壊するとチオエーテル架橋構造がなくN-末端に28残基の延長配列をもつ γ -サブユニットが細胞質内に蓄積した。 γ -サブユニットの遺伝子破壊株を作成し、この28残基を含む γ -サブユニットの遺伝子をプラスミドにより補充したところ、活性なQHNDHが生産されたが、N-末端28残基のない γ -サブユニット遺伝子のプラスミド補充によっては、活性のあるQHNDHの生産は認められなかった。従って、この28残基の延長配列はQHNDHの生合成に必須であるが、成熟型酵素では除去されることが必要であると結論された。

次に、 β -サブユニット遺伝子の後の第5番目にコードされているサブチリシン様セリンプロテアーゼに相同性の高いタンパク質(ORF5タンパク質)についても検討した。ORF5遺伝子破壊株を作成しQHNDH生成に及ぼす影響を調べたところ、ORF2

遺伝子破壊株と同様に、酵素活性が全く消失しただけでなく γ -サブユニットは細胞質内に蓄積していた。また、この蓄積した γ -サブユニットは、分子内チオエーテル架橋構造を有する一方、28残基の延長配列も保持していた。ORF5遺伝子破壊株にORF5遺伝子をプラスミドで補充したところ、 γ -サブユニットは野生株と同様にペリプラズムへ移行し、活性のあるQHNDHが生産された。これらの結果より、ORF5遺伝子もQHNDH生合成に必須であり、ORF5タンパク質は γ -サブユニットの28残基の延長配列の切断除去を行うプロテアーゼであると結論した。さらに、 γ -サブユニットのN-末端延長配列の一部に相当する7アミノ酸残基からなる合成ペプチドのN-末端およびC-末端を蛍光標識し、大腸菌で発現させたORF5タンパク質と一夜反応させた。その結果、反応液の逆相HPLCにより両ペプチドの加水分解産物が同定できた。その切断部位は γ -サブユニットのN-末端延長配列の切断部位と一致した。また、この加水分解反応は非常にゆっくりと進行し、ほとんどターンオーバーしないことが判明した。

一方、N-末端蛍光標識ペプチドとORF5タンパク質の反応液をSDS-PAGEで分析した結果、ORF5タンパク質バンドに蛍光が検出された。この反応後のORF5タンパク質をトリプシンで消化し蛍光ペプチドをHPLCで単離した後、MALDI-TOF質量分析すると、N-末端蛍光標識ペプチドの分解産物とORF5タンパク質の活性中心セリン残基を含むペプチドが含まれていた(図3)。このことは、N-末端

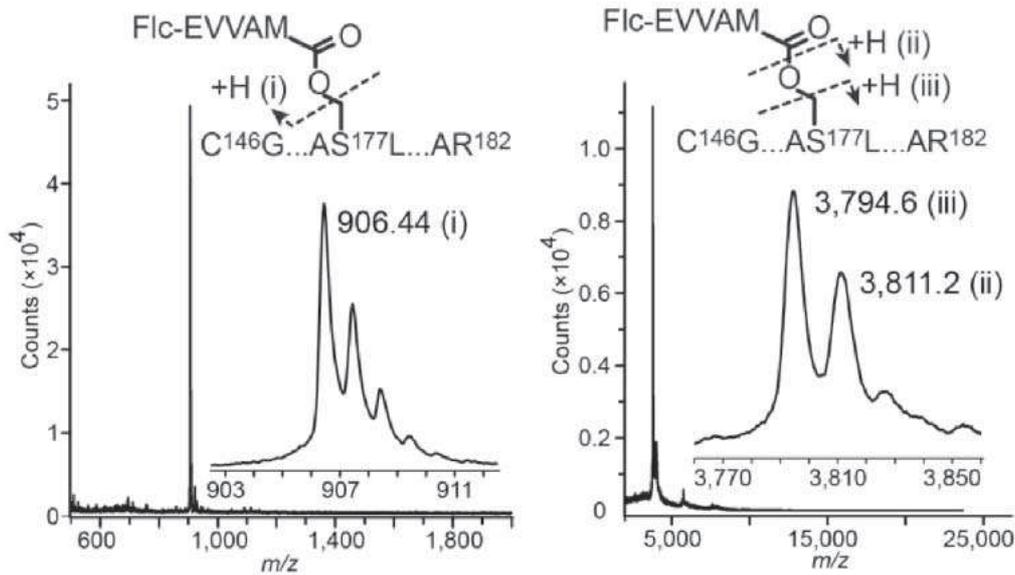


図3. MALDI-TOF MSによるアシル-酵素中間体の同定

蛍光標識ペプチドがORF5タンパク質により加水分解された後、アシル-酵素中間体としてORF5タンパク質の活性中心セリン残基に結合したままとどまっていることを示唆している。以上の結果より、ORF5タンパク質は γ -サブユニットに対しほぼ1対1で機能する非常に奇妙な使い捨て型のプロテアーゼであると考えられる。

なぜこのように一見効率の悪いプロテアーゼがQHNDHの生合成に用いられているのだろうか？ 確かな理由は明らかではないが、使い終えたプロテアーゼによる不必要な消化を回避するためかもしれない。ヒトを含む高等動物ではトリプシンなどのセリンプロテアーゼが消化酵素として働いている。トリプシンは生体内でセルピンというタンパク質の阻害剤により不活性化されることで、他の細胞組織を傷つけないよう巧妙に制御されている。その阻害機構はトリプシンがセルピンのC-末端側を切り離すと同時に、N-末端側がアシル-酵素中間体として活性中心セリン残基に結合したままになるというものであり、ORF5タンパク質の場合とよく類似している。このようなメカニズムは高等真核生物ではよく見られるが、細菌においては筆者の知る限りORF5タンパク質が初めての例である。従って、ORF5タンパク質は細菌では非常に珍しいタイプのプロセッ

シング酵素の代表例と言えるかもしれない。

今後の展開としては、さらに別のタンパク質の関与が推定される複雑な γ -サブユニットの構造形成機構およびペリプラズム移行機構などを解析することで、QHNDHの生合成プロセスの全容を統合的に明らかにしたい。さらに、化学的に困難な反応を触媒するORF2タンパク質をはじめとする修飾因子(酵素)や基質となる γ -サブユニット前駆体の生化学的解析、両者のタンパク質間複合体の結晶構造解析を行うことにより、多段階の翻訳後修飾反応からなるQHNDH生合成プロセスの構造的基盤に基づいた解明を目指している。

末筆ながら、本稿執筆の機会を与えてくださった真嶋哲朗先生と「生産と技術」の関係者の方々に、この場を借りて厚くお礼申し上げます。

引用文献

- (1) Choi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**, 4712–4720, 1995.
- (2) Kim *et al.*, *Nature Struct. Biol.* **9**, 591–596, 2002.
- (3) Nakai *et al.*, *J. Biol. Chem.* **287**, 6530–6538, 2012.
- (4) Ono *et al.*, *J. Biol. Chem.* **281**, 13672–13684, 2006.