

フラビン依存性オピン脱水素酵素の触媒機構の解明と産業応用

渡辺 誠也

愛媛大学大学院 農学研究科

研究の目的

オクトピンとノパリンは、根頭癌腫病（こんとうがんしゅびょう）の原因菌である *Agrobacterium tumefaciens* が、クラウンゴール（虫こぶ）内で作る物質である。これを合成するのは細胞質にある NAD(P)H 依存性脱水素酵素であり、オクトピンであればピルビン酸、ノパリンであれば α -ケトグルタル酸を α -ケト酸とし、L-アルギニンとの還元的縮合反応により生成する。この細菌は膜に局在する脱水素酵素を持っており、これによりオピンをもとの栄養分に分解することで虫こぶ内で独占的に生育することができる。すなわち、この分解酵素の解析は根頭癌腫病に対する農薬開発につながる可能性がある。我々は以前、非植物病原菌である *Pseudomonas putida* KT2440 および *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の持つ本酵素のホモログを初めて生化学的に解析した。この新規酵素オピン脱水素酵素は FAD あるいは FMN を補欠分子族とする色素依存性脱水素酵素に分類され、有機酸やアミノ酸、アルコールなどを、Cl₂Ind のような人工電子受容体存在下で酸化できる。この反応を利用すれば、人工色素をメディエーターとして酵素反応と電極を直接結びつけることが可能となるため、物質の濃度を電気化学的信号として簡便に検出するバイオセンサー用素子や生体物質を起電力とするバイオ電池用素子として利用できる。こうした知見に基づき本研究では、土壌細菌 *Aureimonas altamirensis* 由来のフラビン依存性 Odh の結晶構造を決定し、その触媒反応機構を原子レベルで明らかにすることを旨とする。

方法

①AaOdhB3 遺伝子の発現・精製系の構築

A. altamirensis の推定オピン脱水素酵素である AaOdhB3 遺伝子（AUL31_RS11475）を pACYC-Duet ベクターにサブクローニングし、*E. coli* BL21(DE3) に形質転換した。N 末端にヒスチジンタグを付加した組み換え AaOdhB3 は IPTG で発現誘導し、Ni-NTA superflow column で精製した。

②AaOdhB3 の機能解析

精製した AaOdhB3 を、人工電子受容体 (*p*-ヨードニトロテトラゾリウムバイオレット) 及びメディエーター (フェナジンメトスルフェイト) の存在下でノパリン及びオクトピンと反応させ、精製された L-アルギニンをアミノ酸分析装置で定量した。

③AaOdhB3 の予備的結晶化

Index HT 及び Crystal Screen HT (いずれも HAMPTON RESEARCH 社製) の結晶化スクリーニングキットを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法によりスクリーニ

ングを行った。約 16 mg/mL に調整した AaOdhB3 溶液を 0.5 μ L を等量のリザーバー溶液と混合し、リザーバー溶液 70 μ L とともに密封し 20 $^{\circ}$ C で結晶化させた。その結果、Index HT では A4 \cdot C3 \cdot G2、Crystal Screen HT では B3 \cdot F10 \cdot G2 \cdot H2 の条件で結晶が見られた。

④結晶化条件の最適化

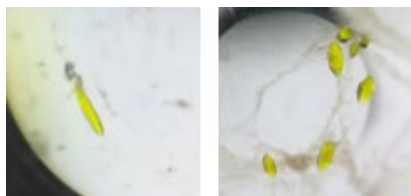


図 1. ネイティブ（左）と Se-Met 置換体（右）の結晶

予備的結晶化で得られた結晶の中で、特に良質だったのは Index HT G2 \cdot Crystal Screen HT F10 \cdot Crystal Screen HT G2 だった。そこで、これらの条件のバッファー pH と沈殿剤の濃度の条件を少しずつ変えて最適化を行った。最終的に Index HT G2 (0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS (pH 5.5), 25% (w/v) PEG 3350) の条件で出た結晶を構造解析に用いた。

⑤ネイティブ結晶のデータ収集

SPring-8 のビームライン BL45XU で 2 \AA 以上の高分解能の回折データを得ることができた。しかし、既知の構造をモデル分子として構造決定を行う分子置換法では、配列相同性が 20% と低いせいか位相決定が出来なかった。

⑥Se-Met 置換体 AaOdhB3 を用いた構造決定

位相決定を試みるために、セレノメチオニン置換体タンパク質を用いた異常分散法によって構造解析を行うことにした。セレノメチオニン含有の最少培地で大腸菌を培養・精製し、ネイティブ酵素と同様に Index HT G2 の条件で結晶の最適化を行った。最終的に、1.5 \AA という高分解能で AaOdhB3 の構造決定に成功した。

⑦部位特異的変異体の作成

得られた立体構造情報をもとに、活性部位と推定される部分の近傍に位置するアミノ酸残基のアラニン変異体を作成し、活性測定を行った。

結果

AaOdhB3 は、結晶化スクリーニングキットの複数の条件で結晶が出た。そのいずれもが鮮やかな黄色であり、フラビンが結合していることが示唆された (図 1)。分子置換法では位相が決定できなかったため、セレノメチオニン置換体の結晶を作成し位相を決定し、最終的に 1.5 \AA 分解能で構造決定に成功した。AaOdhB3 は二量体からなり、各サブユニットは FAD 結合ドメインと基質結合ドメインの二つから構成されていた (図 2 左)。サブユニットの全体構造は、グリシンオキシダーゼ \cdot D-アル

ギニンデヒドロゲナーゼ・L-グルタミン酸オキシダーゼといったフラビン依存的に酸化脱アミノ化を触媒する酵素と類似していたが、相同性はいずれも 30%程度と低かった。FAD は、FAD 結合ドメイン内の Ile11・Thr38・Ser39・Trp45・Val178・Val340・Thr341 と相互作用し強固に結合していた (図 2 右)。AaOdhB3 の二量体の Chain A と B のうち、Chain A の推定活性部位には結晶化条件に由来する PEG が結合していた (図 3)。2 つのサブユニットを重ねてみると、Chain A の Tyr57・His337・Arg312・Glu50 といった残基の側鎖の位置が大きく変化しており、 β_3 と α_6 の間のループの一部が disorder していた。

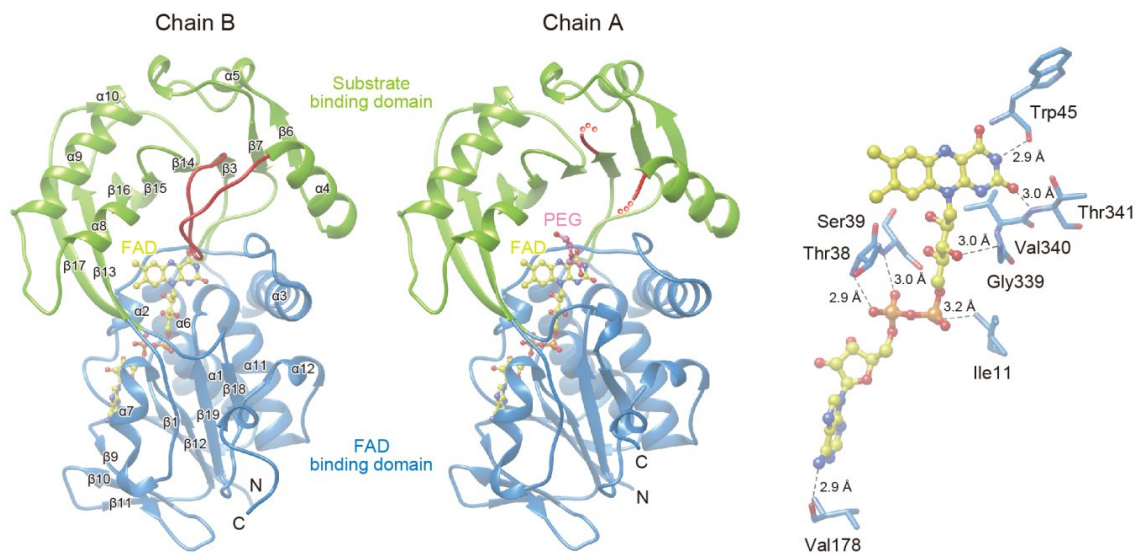


図 2. AaOdhB3 の全体構造 (左) と FAD 結合の様子 (右)

市販されているノパリンとオクトピンを用いた活性測定の結果、AaOdhB3 はノパリンのみを基質とし α -ケトグルタル酸と L-アルギニンを生じることが分かった。そこで、これらの化合物との共結晶を作製したが、差フーリエマップでは明瞭な電子密度は得られなかった。そこで、上記 Chain A と B 間の構造変化は基質結合に伴う開閉を一部反映していると考え、基質結合部位の候補となるアミノ酸残基を 17 個選抜しアラニン変異体を作成した。各変異体酵素を精製し活性を測定したところ、Trp45・Arg312・His337・Ser338・Thr341 は完全に失活し、Glu50・Tyr57・Arg247・Pro315 は大幅に活性が低下した。下線は上記構造変化をする残基であり、予想通り活性部位の一部と考えられる。これらの残基は類似酵素のいずれとも異なっており、複雑な骨格を持つオピンに対する基質特異性を反映していると思われる。

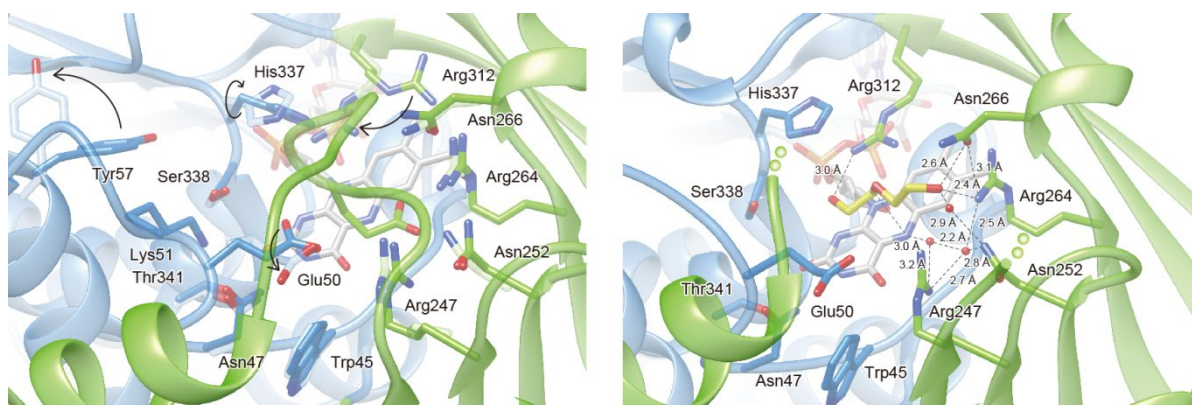


図 3. Chain A・B 間の構造変化（左）と PEG 結合の様子（右）

結論

今回、フラビン依存性オピン脱水素酵素の立体構造を世界で初めて決定することに成功した。一方、AaOdhB3 のノパリンに対する活性は微弱であることから、以下の 2 つの可能性が考えられる。一つ目は、ノパリン以外により優れた基質がある可能性である。オピンは α -ケト酸と L-アミノ酸が縮合したものであり、このうち前者は α -ケトグルタル酸であることが本酵素には必須だが、後者については L-アルギニン以外は試していない。これについては、考えられるすべてのオピンを有機化学的に合成するなどして、基質特異性を精査する必要がある。二つ目は、AaOdhB3 は実はヘテロ型オピン脱水素酵素の触媒サブユニットであるという可能性である。現在はこうした仮説の検証を行っているところである。

文献

なし