

酸化発酵に関わる酵素の X 線結晶構造解析

X-ray crystallographic study of enzymes involved in the oxidative fermentation

後藤 勝^{1*}、小東 陽¹、東山 司¹、川畑 成由¹、乾 絵理捺¹、

泉水 まどか¹、内藤 快人¹、野田 将平¹

¹ 東邦大学理学部, 〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

Masaru Goto¹, Akira Kohigashi¹, Tsukasa Higashiyama¹, Naruyoshi Kawabata¹,

Erina Inui¹, Madoka Sensui¹, Hayato Naitoh¹, Syohei Noda¹

¹ Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan

1 はじめに

酢酸菌は、花、果実、および果実酒などの中で、高濃度の糖やアルコールをさまざまな有機酸として酸化的に変換し培地中に高濃度に蓄積する能力を持っている。この酸化反応は、細胞膜表層において行われる呼吸鎖と直接リンクし好氣的に進行する。蓄積した有機酸は培地の pH を低下させ、競合する微生物には厳しい生育環境をもたらすことになる。このような糖やアルコールの酸化反応は、酢酸菌の典型的な代謝様式であり、酸化発酵と呼ばれて、酵母や乳酸菌の行うアルコール発酵や乳酸発酵のような一般的な発酵と区別される。酢酸菌の酸化発酵に関わる酸化還元酵素は、触媒反応の過程で基質から奪った電子を、細胞膜中に存在する脂溶性の電子受容体であるユビキノロンに渡す。その結果還元されて生じるユビキノールが、細胞膜に内在しているユビキノールオキシダーゼによって酸化されることで、その呼吸鎖反応を完結する。さらに、酸化発酵に特有の二段階育成の後期では、蓄積された有機酸が取り込まれ、資化されることで増殖のエネルギーが得られている。このような特徴ある酢酸菌の酸化発酵には、多数の膜結合型の酸化還元酵素と細胞質に存在する 70 種類を超える水溶性の酸化還元酵素が関与していると考えられている。これらの機能の発現機構を、まずは個々の立体構造から明らかにし、その後それらの酵素複合体の構造や相互作用の予測などから、生物システムとして解明していくことを目標としている。

本研究では、最初のステップとして、個々の立体構造から機能の発現機構を明らかにすることを目的として、酢酸菌の酸化発酵に関わる酵素の中から、酢酸発酵の初発脱水素酵素である PQQ 依存性膜結合型アルコール脱水素酵素、グルコン酸発酵に関わる PQQ 依存性膜貫通型グルコース脱水素酵素、ジヒドロキシアセトン発酵に関わる PQQ 依存性膜貫通型グリセロール脱水素酵素、さらにジヒドロキシアセトンの資化に関わる 4 種類の水溶性の酸化還元酵素に注目している。

2 実験

膜結合型アルコール脱水素酵素および膜貫通型グルコース脱水素酵素については、すでに 3.0 および 6.0 Å 分解能程度のデータセットの収集に成功しているため、より良い分解能のデータ収集を目指して、結晶の脱水を含めた結晶化後処理の試行錯誤を行った。NADH 依存性ジヒドロキシアセトン還元酵素については、NAD⁺との複合体の結晶の作成に成功しており、2S,3S-ブタンジオールに対する約 90.0 U/mg という立体構造が既知の同種の酵素の 20 倍以上の比活性の高さを利用した NAD⁺複合体結晶への基質のソーキングによる NAD⁺と基質の三者複合体の電子密度の確認を行った。NADPH 依存性ジヒドロキシアセトン還元酵素については、酢酸菌から直接精製したサンプルと大腸菌によるリコンビナントサンプルは、ジヒドロキシアセトンに対する比活性が、それぞれ 13.8 U/mg および 1.3 U/mg となり、その活性に大きな差が出ていることから、両者の立体構造の相違を調べるために、それぞれのネイティブ結晶のデータ測定を行った。FAD を補酵素とし、ジヒドロキシアセトンを電子受容体として NADH 酸化反応を触媒する New Yellow enzyme (NYE) は、酢酸菌から精製した場合、FAD を保持しているが、大腸菌によるリコンビナントの場合、FAD を保持していないだけではなく、精製後に FAD を添加しても強く保持できず、透析によって FAD は取り除かれてしまう。この原因を調査するために、発現源の異なる 2 種の NYE のネイティブ結晶の X 線結晶構造解析を行った。

3 結果および考察

PQQ 依存性の 2 種の膜タンパク質の高分解能データ収集を目指した脱水などの結晶化後処理においては、すべての試みにおいて回折点の減少および消失という結果となり、分解能向上の目標は達成できていない。しかし、膜結合型アルコール脱水素酵素において、構造決定に至った硫酸アンモニウムを主な沈殿剤とする条件以外にも脱水処理に適していると思われる PEG を主な沈殿剤とする条件での結晶化条件の発見と再現性の確認により、今後進展がみられることを期待している。

NADH 依存性ジヒドロキシアセトン還元酵素のソーキングによる NAD⁺と基質の三者複合体作成の試

みにおいて、さまざまな基質の種類やその濃度とソーキング時間などを組み合わせた条件下で、ほとんど 2.0 Å 分解能を超える良質なデータを得ることができたが、いずれにおいても基質の電子密度の確認はできなかった。

NADPH 依存性ジヒドロキシアセトン還元酵素については、酢酸菌から精製したサンプルと大腸菌によるリコンビナントサンプルのネイティブ結晶からデータを収集した。酢酸菌のサンプルからは、空間群 $P2_1$ 、格子定数 $a = 60.35$, $b = 118.04$, $c = 76.37$ Å, $\beta = 95.14^\circ$ 、分解能 1.90 Å のデータを、大腸菌リコンビナントからは、空間群 $C222_1$ 、格子定数 $a = 61.24$, $b = 84.48$, $c = 119.27$ Å、分解能 1.95 Å のデータをそれぞれ得た。これら 2 種の立体構造を決定し、主鎖の $C\alpha$ 炭素で重ね合わせたところ、その $C\alpha$ 原子間の距離の r.m.s.d. は 0.30 Å であった。結局、これら 2 種類の構造の比較から、これらにはサブユニット構造および二量体間の相互作用に差がないこと、また電子密度からどちらも翻訳後修飾を受けていないことを確認した。これらのことからリコンビナント NADPH 依存性ジヒドロキシアセトン還元酵素の比活性の低さの原因は、電子密度の見えていない、発現ベクター由来の N 末端にあると考えている。

NYE についても酢酸菌から直接精製したサンプルと大腸菌によるリコンビナントサンプルのネイティブ結晶から X 線回折強度データの収集を行った。酢酸菌からのサンプルの結晶は、黄色を呈しており、空間群 $F23$ 、格子定数 $a = b = c = 169.95$ Å、分解能 1.4 Å のデータから、補酵素 FAD の FMN 部分の電子密度が 3 量体のサブユニットインターフェースにそれぞれ一つずつ確認できる。なお、この NYE は FMN ではなく FAD の添加によって活性が得られることが明らかとなっている。大腸菌リコンビナントサンプルの結晶は、無色透明であり、空間群 $F23$ 、格子定数 $a = b = c = 168.99$ Å、分解能 2.25 Å のデータからは、やはり FAD の電子密度は確認されていない。このリコンビナントサンプルには、His-tag などは付与しておらず、酢酸菌のサンプルとのアミノ酸配列の相同性は 100% である。この 2 種の立体構造の重ね合わせをしたところ、主鎖の $C\alpha$ 原子間の距離の r.m.s.d. は 0.20 Å であり、違いはほとんどないといえる。もともとこのタンパク質の遺伝子のアノテーションは、クロロペルオキシダーゼとなっているため、構造既知のクロロペルオキシダーゼとアミノ酸配列の比較をしたところ、活性部位の残基はほとんど保存されており、特に触媒の三つ組み残基 (Asp-His-Ser) も保存されているため、NYE としての機能だけでなくクロロペルオキシダーゼの活性も保持している可能性がある。このクロロペルオキシダーゼの活性部位はタンパク質の TIM バレル構造の中心に位置しており、FAD 結合部位とは離れている。より詳しく調べるために、電子密度を精査していると、酢酸菌からのサンプルのクロロペルオキ

シダーゼの活性部位、特に触媒三つ組みを構成する活性セリン残基の側鎖に五炭糖のような電子密度が繋がっていることを確認した (図)。しかし、この電子密度に相当するものはリコンビナントサンプルの結晶からは見出されなかった。このことより、酢酸菌には大腸菌と異なる修飾機構があり、NYE はクロロペルオキシダーゼの活性部位に修飾を受けることで、その活性を発現できないようにし、NYE としての機能だけを発現させていると考えられる。今回決定した 2 種の立体構造に大きな相違はないため、FAD の結合能の解明には至っていないが、この糖による修飾が関与している可能性はあると考えている。

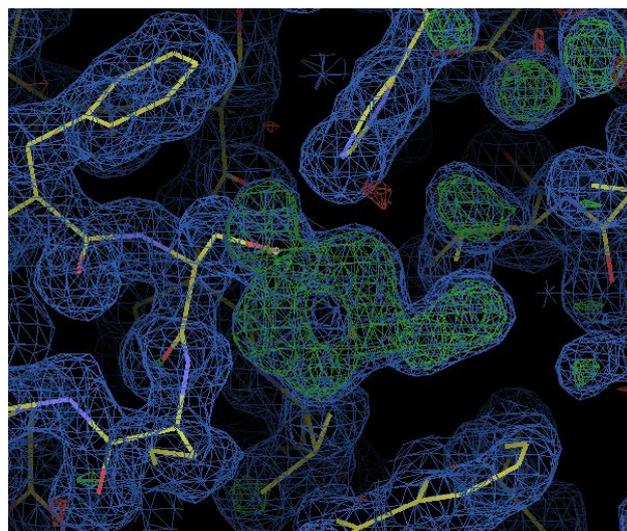


図 NYE の電子密度
触媒残基である Ser95 残基の側鎖のヒドロキシ基に糖のような電子密度が付随している。

4 まとめ

今回の課題によって酢酸菌由来の酵素タンパク質の立体構造を数種類決定することができた。しかしながら、簡便で大量に精製サンプルを得ることができる大腸菌を用いた発現系および His-tag の付与を利用することによる弊害を痛感する結果となった。酢酸菌から各種酵素を精製するには、700 グラム程度の酢酸菌が必要であり、そこから数ミリグラムの酵素を抽出するには職人芸ともいえる技術が必要のため、現在、酢酸菌を用いた大量発現系の構築を行っている。次回の申請では、同種間発現系より入手したサンプルを用いて目的タンパク質の機能発現のメカニズムの解明を目指す。

* goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp