

ヘテロ六量体型芳香環二水酸化酵素における電子受容機構の構造基盤

Structural basis of the electron transfer mechanism in heterohexamer-type ring-hydroxylating oxygenases

水口 千穂^{1,2}, 蔡 弼丞¹, 寺田 透^{1,2}, 野尻 秀昭^{1,2,*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター

² 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Chiho SUZUKI-MINAKUCHI^{1,2}, Pi-Cheng TSAI¹, Tohru TERADA^{1,2}, and Hideaki NOJIRI^{1,2,*}

¹ Agro-Biotechnology Research Center, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

² Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

Rieske non-heme iron dioxxygenase (RO) は、様々な芳香族化合物の分解において初発反応を担うことが知られている [1]。クメンジオキシゲナーゼ (CumDO) は *Pseudomonas fluorescens* IP01 株のクメン (isopropylbenzene) 分解経路の初発反応を担う酵素であり、反応を触媒する酸化酵素 (CumDO-O) と、NAD(P)H からの電子を CumDO-O に渡すための電子伝達酵素 [還元酵素 (CumDO-R) と、CumDO-R から CumDO-O に電子を受け渡すフェレドキシン (CumDO-F)] から構成される [2]。CumDO-O を含む RO の酸化酵素の多くは、各 3 つの α , β サブユニットから成るヘテロ六量体型の構造をとる。我々は過去に共同研究として CumDO-O の結晶構造を報告した [3]。一方、CumDO-F については結晶構造の報告は無い。本研究では CumDO-F の CumDO-O に対する結合位置を明らかにするため、両者の共結晶構造の取得を試みた。また、CumDO-O のアラニン置換体を用いることで、CumDO-O が CumDO-F から電子を受け取るために重要な残基の同定を行った。

2 実験

CumDO-O については大腸菌 JM109(DE3)株を宿主とし、 α サブユニットと β サブユニットを同一のベクター pUC118 から発現させた。 α サブユニットの C 末端側に 6 × His-tag を付加し、固定化金属アフィニティクロマトグラフィーにより β サブユニットとの共精製を行った。さらにゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで、SDS-PAGE で α , β サブユニットがほぼ単一のバンドとなっていることを確認した。CumDO-F については大腸菌 BL21(DE3)株を宿主とし、N 末端側に 6 × His-tag を付加した形で pET-26b(+) から発現させ、CumDO-O と同様に精製した。過去の研究 [4] から、CumDO-O 六量体一分子に対して CumDO-F 単量体は三分子結合すると考えら

れたため、精製した CumDO-O と CumDO-F をモル比で 1:3 となるように混合し、結晶化条件のスクリーニングを行った。

一方、CumDO-O の結晶構造と CumDO-F のモデル構造を用いたドッキングシミュレーションからは、CumDO-F の結合位置として、CumDO-O の上部 (図 1 左) と側面 (図 1 右、 α サブユニットと β サブユニットの境界面) の二箇所が予測された。

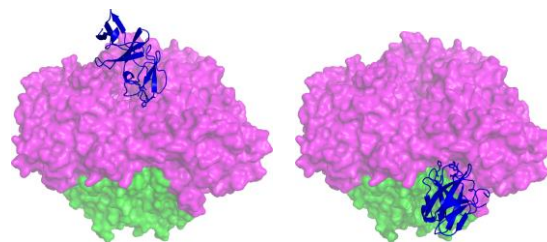


図 1: ドッキングシミュレーションから予測された CumDO-F の結合位置。CumDO-F を青色のリボンモデルで、CumDO-O の表面構造を赤紫色 (α サブユニット) と緑色 (β サブユニット) で示した。

そこで、CumDO-O の上部に位置する α サブユニット表面の 8 つのアミノ酸残基と、側面に位置する α , β サブユニット表面の 8 つのアミノ酸残基についてアラニン置換体を作製した。CumDO-O が CumDO-F から電子を受け取り還元されると、波長 457 nm の吸光度が低下することを利用し、CumDO-O アラニン置換体への電子伝達効率を評価した。分光光度計内のキュベットに CumDO-R, CumDO-F, CumDO-O 混合溶液を入れ、攪拌しながら NADH を添加し、波長 457 nm の吸光度の変化を測定した。NADH 添加直後に吸光度が低下する際の直線の傾きを CumDO-O の還元効率 (CumDO-F から CumDO-O への電子伝達効率) として評価した。

3 結果および考察

スクリーニングの結果、0.1 M MES (pH6.4~6.5) または 0.1 M HEPES (pH6.6~6.8), 1.4~1.6 M sodium malonate, 0.7% (v/v) Jeffamine ED-2001 を含む結晶化試薬と CumDO-O, CumDO-F 混合溶液を 1:1 で混合し、蒸気拡散法を用いて 20°C で 3~5 日静置することで結晶が得られた。しかし、これらの結晶について Photon Factory にて X 線回折データを取得し構造決定を行ったところ、いずれも CumDO-O のみから成る結晶であることが明らかとなった。なお、後述する電子伝達効率が低下した CumDO-O アラニン置換体を用いたスクリーニングも同様に実施したが、CumDO-F を含む共結晶は得られなかった。

CumDO-O アラニン置換体を用いた電子伝達効率の評価では、CumDO-O の上部に位置するアミノ酸残基をアラニンに置換した際には顕著な変化が見られなかった。一方、側面に位置する K117 (α サブユニット, 以下 α K117 と表記) と R65 (β サブユニット, 以下 β R65 と表記) をアラニンに置換した際には、それぞれ 21%, 46% まで CumDO-O の還元効率が低下した。両アミノ酸残基をアラニンに置換した二重置換体では、CumDO-O の還元効率は 20% 未満まで低下した。CumDO-O 側面の α , β サブユニット境界面には、 α K117 と β R65 を含む領域に窪みが存在しており (図 2), ここに CumDO-F が結合すると推測された。また、CumDO-O の α K117 と β R65 はトルエンジオキシゲナーゼ [5], ビフェニルジオキシゲナーゼ [6], ナフタレンジオキシゲナーゼ [7] など、CumDO-O と同様にヘテロ六量体型の構造をとり、かつ電子供与体が Rieske 型フェレドキシンである酸化酵素でも保存されていた。

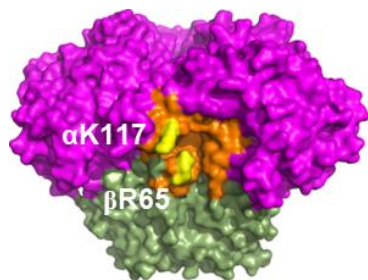


図 2 : CumDO-O の側面に位置する CumDO-F の予想結合位置。CumDO-O の表面構造を赤紫色 (α サブユニット) と深緑色 (β サブユニット) で、CumDO-F の予想結合位置を橙色で示した。また、 α K117 と β R65 の位置を黄色で示した。

上述の結果より CumDO-F は CumDO-O の側面に結合することが強く示唆されたため、両者が結合しているモデル構造を作成し、CumDO-F から CumDO-O への電子伝達経路を予測した。作成したモデル構造では、CumDO-F の鉄硫黄クラスターから CumDO-O の活性中心である非ヘム鉄までの距離は 19 Å であり、CumDO-O の鉄硫黄クラスターまでの距離 (15 Å) よ

りも長かった (図 3)。このことから、電子は CumDO-F から CumDO-O の鉄硫黄クラスターを介して非ヘム鉄へと伝達すると考えられた (図 3)。

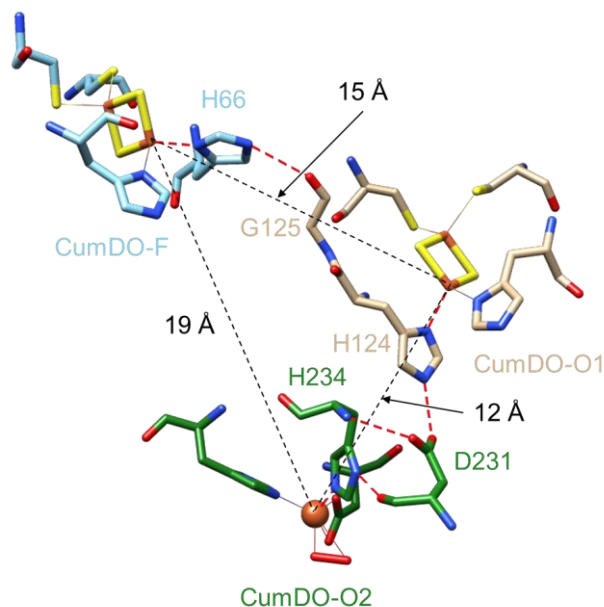


図 3 : CumDO-F, CumDO-O のモデル構造から予測された電子伝達経路。CumDO-F の鉄硫黄クラスター、CumDO-O の鉄硫黄クラスターと非ヘム鉄の間の距離を図中に示した。また、電子伝達に関与すると考えられる水素結合を赤色の破線で示した。

4 まとめ

本研究では残念ながら CumDO-O と CumDO-F の共結晶構造の取得には至らなかった。しかし、CumDO-O アラニン置換体を用いた解析から、CumDO-F の結合位置が CumDO-O 側面であることが強く示唆された。また、 α K117 と β R65 が他の酸化酵素でも保存されていたことから、本研究で見出した CumDO-F と CumDO-O の結合様式は類似の構造と電子伝達様式を持つヘテロ六量体型芳香環二水酸化酵素に共通するものと考えられた。一般に、フェレドキシンと酸化酵素は短時間で何回も結合・解離を繰り返すと言われており、この結合・解離の速さが CumDO-O と CumDO-F の共結晶が得られなかった原因となっている可能性がある。今後、CumDO-F が CumDO-O の側面に結合することを直接的に証明するためには、化学的に両者を架橋して結合位置を調べるなどの工夫が必要だろう。

参考文献

- [1] D.J. Ferraro *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 175-90 (2005).
- [2] H. Aoki *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 187-96 (1996).
- [3] X. Dong *et al.*, *J. Bacteriol.* **187**, 2483-90 (2005).
- [4] Y. Ashikawa *et al.*, *Structure* **14**, 1779-89 (2006).
- [5] R. Friemann *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **65**, 24-33 (2009).

[6] Y. Furusawa *et al.*, *J. Mol. Biol.* **342**, 1041-52 (2004).

[7] B. Kauppi *et al.*, *Structure* **6**, 571-86 (1998).

成果

1. P.C. Tsai *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **88**, e0083522 (2022).

* anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp