

新しいビルトイン型キノン補酵素とその生成機構



谷澤克行*

A Novel Built-in-Type Quinone Cofactor and Mechanism of Its Biogenesis

Key Words : Quinone Cofactor, Quinoprotein, Post-translational Modification

1. はじめに

酵素タンパク質が多様な触媒機能を発揮するためには補酵素が必要である。ビルトイン型補酵素は、ビタミン由来の補酵素と異なって、タンパク質を構成するアミノ酸残基が特異的な翻訳後修飾を受けて生成する。ビルトイン型補酵素を形成するためにタンパク質はさまざまな戦略を用いている。私たちの研究室では、最近、アミノキシダーゼに含まれるビルトイン型補酵素、トパキノンが銅イオン依存的に自動的に生成する過程を時間分割X線結晶解析により追跡し、その過程における活性部位の構造変化を明らかにした。他方、新しいビルトイン型キノン補酵素、システイントリプトフィルキノン(CTQ)をキノヘムタンパク質・アミンデヒドロゲナーゼ(QHNDH)に見いだした。CTQは、21世紀になり世界で初めて発見された補酵素で、1999年に本誌(51巻)の研究ノートの中で紹介したビルトイン型補酵素には含まれていなかったものである。さらに、CTQを含有するQHNDHの中の小さな γ -サブユニットは、3個の新規な分子内チオエーテル架橋により極めて特異な構造をもっていた。このように、ビルトイン型キノン補酵素に関する研究は、急速に新たな展開を見せて

おり、ここでは、CTQを含有するQHNDHのX線結晶構造と γ -サブユニットの翻訳後修飾に関わる新規な鉄イオウタンパク質の機能について紹介する。

2. QHNDHの立体構造

酵素タンパク質中に新規な補酵素が見つかることは、それほどたびたびあることではなく、ビルトイン型補酵素に限っても、1996年に構造決定されたりジルチロシルキノン(LTQと略称)以来見つからない。しかし2001年になって、私たちはQHNDHに新しいビルトイン型キノン補酵素、CTQ(図1B, C)を見いだした。補欠分子としてキノンとヘムを併せもつ酵素のQHNDH自身は、2種類のグラム陰性細菌、*Paracoccus denitrificans* と *Pseudomonas putida* とから別々に単離されそれらの酵素学的性質が調べられたが、後に遺伝子構造と立体構造が決定されると¹⁻³⁾、両者は驚くほど似ていた。本酵素は3つの異なるサブユニット(α , β , および γ)から構成されており、一級アミン類を脱水素してアルデヒドに酸化する反応を触媒する。両細菌の培地中に n -ブチルアミンやベンジルアミンを加えると、これらをエネルギー源として資化するため、本酵素が細胞膜内のペリプラズム画分に誘導生成される。先に述べた銅含有アミノキシダーゼとは異なり、触媒反応においては、基質アミンに由来する2電子はキノン補酵素、ヘム c を経由して、アズリンやチトクロム $c550$ などの電子受容体タンパク質に受け渡され、最終的には末端酸化酵素により分子状酸素の水への還元に使われる。 α -サブユニットには2分子のヘム c が結合しており、 γ -サブユニットにはキノン補酵素が含まれていることが分かっていた。しかし、このキノン補酵素の同定はもとより、 γ -サブユニット全体のアミノ酸配列すらもタンパク質化学的に決定することは非常に困



*Katsuyuki TANIZAWA

1948年10月生

昭和52年3月京都大学大学院農学研究科

博士課程農芸化学専攻単位修得退学

現在、大阪大学、産業科学研究所、生体

応答科学研究部門、教授、農学博士、生

化学・構造生物科学・生物工学

TEL 06-6879-8460

FAX 06-6879-8460

E-mail : tanizawa@sanken.osaka-u.

ac.jp

難であった。キノン補酵素とそれを含む γ -サブユニットの化学構造に関する疑問は、*P. dentirificans*と*Ps. putida*のQHNDHの立体構造が相次いで決定されることによって氷解した。X線結晶解析の結果、両細菌酵素の一次構造の相同性はそれほど高くないが、立体構造は非常に類似していることが判明した。すなわち、約60 kDaの α -サブユニットは、互いに独立したフォールディングをもつ4個のドメイン(I~IV)で構成され、おもに α -ヘリックスからなるドメインIはドメイン内に擬2回対称軸をもち、2分子のヘムcはシステイン残基とチオエーテル結合でそれぞれドメインIに共有結合していた。約40 kDaの β -サブユニットは、メチルアミンデヒドロゲナーゼやメタノールデヒドロゲナーゼなど他の多くのキノプロテイン・デヒドロゲナーゼで見られる7枚羽根の β -プロペラ構造をもっていた。最も小さな γ -サブユニット(約9 kDa)は、 α 、 β 両サブユニット間に挟まれるように分子内に埋もれて存在していた。 γ -サブユニット遺伝子の塩基配列から予測されるアミノ酸配列(79及び82残基)中では4個のシステイン残基と5個のトリプトファン残基を含むが、遊離のSH基やS-S結合はまったく検出されなかった。慎重な分子モデリングの結果、キノン補酵素は、Trp残基のC6位とC7位とがオルトキノン型に酸化されていると同時に、C4位に同一ポリペプチド内のCys残基の側鎖SH基がチオエーテル結合で架橋したシステイントリプトフィルキノン(CTQ)であることが分かった(図1B, C)。さらに、驚くべきことに、残りの3個のCys残基がその側鎖SH基で、Asp残基またはGlu残基のメチレン炭素にチオエーテル結合していることが判明した(図1B, C)。ガラクトースオキシダーゼでは、Tyr残基のフェノール環炭素にCys残基がチオエーテル結合しているが、酸性残基のメチレン炭素との間のチオエーテル結合はタンパク質中ではこれまでに見いだされていない。このようなチオエーテル結合は一般的なS-S還元剤では切断されない安定な結合であるので、SH基の定量ができないのは当然であった。また、質量分析の結果もこれらの架橋構造を考慮することで完全に解釈することができた。 γ -サブユニットはこれら4ヶ所の分子内架橋によって、折れ曲がりの多い立体構造を維持していると考えられた。

3. γ -サブユニットの翻訳後修飾機構

補酵素CTQとこれを含めた計4ヶ所のチオエーテル結合はどのようにして形成されるのであろうか? 化学量論的には、1分子の γ -サブユニット全体で10電子の出入りを伴う酸化反応であるが、その生成機構の解明はメチルアミンデヒドロゲナーゼのTTQ補酵素の形成機構とともに今後に残された研究課題である。少なくとも、AspやGluといった酸性残基の反応性の低いメチレン炭素とCys残基SH基との間のチオエーテル結合は、通常の求核反応などによって自動的に形成されることは困難と思われる。恐らく何らかの修飾酵素の関与のもとにラジカルを中間体とした複雑な反応様式が必要であろう。また、上述のアミノキシダーゼと異なり、Trp残基インドール環のオルトキノンへの酸化も自己触媒的に起るとは考えにくい(QHNDHにはヘム鉄以外に金属イオンが含まれていない)。実は、遺伝子解析の結果、その候補となるタンパク質(ORF2)が、 α -サブユニットと γ -サブユニット遺伝子の間にコードされていることが分かった(図1A)。この機能未知のタンパク質配列中には、鉄-硫黄クラスターおよびS-アデノシルメチオニンの結合部位が含まれており、ラジカル-SAMスーパーファミリーとよばれるタンパク質群と部分的な相同性を示した。リポ酸合成酵素やビオチン合成酵素など、S-アデノシルメチオニンを解裂して生じるアデノシルラジカルを利用して、炭素-硫黄結合の形成反応を触媒する酵素がこのファミリーに含まれている。このことから、このタンパク質が γ -サブユニットのユニークな構造形成に何らかの関与をしていると考えられた。実際、ORF2遺伝子の破壊により活性なQHNDHが生成されなくなることを確認しており(未発表)、その可能性は高い。さらに興味深いことに、 α -サブユニットと β -サブユニットのN末端上流にはQHNDHのペリプラズム画分への移行に関わると推定されるシグナルペプチド配列が存在するが、 γ -サブユニットとORF2タンパク質には存在しないと考えられていた。しかし、ORF2遺伝子破壊株から単離した不活性なQHNDHの γ -サブユニットポリペプチド中には、シグナルペプチドが含まれる一方で、CTQもCys-Glu/Asp間のチオエーテル架橋構造は含まれていないことが判明した。これらの結果より、 γ -サブユニットの翻訳後修飾は、ポリペプチド鎖の翻訳

過程あるいはその直後に、少なくともORF2タンパク質を含む変換因子(群)により細胞質内で進行すると考えられる。また、ORF2タンパク質はラジカルSAMタンパク質としてQHNDH生成に必須の役割を果

たしていることが明らかとなった。今後、ORF2タンパク質と本酵素の各サブユニットを大腸菌などで発現させ、大腸菌内あるいは試験管内で活性のあるQHNDHを生成させることにより、CTQの生成機構や γ -サブユニットのユニークな分子内架橋構造の形成機構を解明する道が拓けると期待している。

文 献

- 1) Vandenberghe, I., *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 276, 42923-42931(2001)
- 2) Datta, S., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14268-14273(2001)
- 3) Satoh, A., *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 277, 2830-2834(2002)

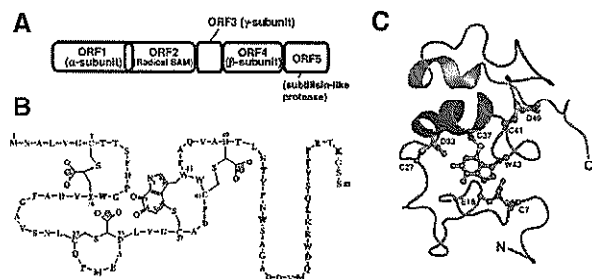


図1 QHNDHオペロンの遺伝子構造(A), γ -サブユニットの模式図(B)と立体構造モデル(C)

