

《日本農芸化学会賞》

産業利用を目指したタンパク質構造解析



東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 教授 田之倉 優

産業においては、環境問題に対する関心の高まりとともにモノを製造するだけでなく、使用後の廃棄、および廃棄物質の生態系への影響についても責任が問われる時代となっている。自然界において分解しにくい難分解性化合物や有害化合物などの環境汚染物質を浄化する技術開発が急務となっている。その中で、微生物の酵素を利用した浄化システム（バイオレメディエーション）は、化学的浄化システムと比較して、低コスト、かつマイルドな条件下で安全に環境汚染物質を分解できることから特に注目を集めている。バイオレメディエーションでは、タンパク質工学を利用して酵素の分解能力の向上、改変、大量生産につなげることが可能であるが、酵素の基質認識や反応機構はその立体構造に基づいているので、酵素の立体構造を原子レベルで知ることが必要不可欠である。筆者は、産業上重要なさまざまな酵素の立体構造解析を通じて、基質認識機構や反応機構を原子レベルで解明し、その成果を産業に利用することを目指した研究に取り組んできた。以下にその概要を述べる。

1. リボヌクレアーゼ RNase T₁ の構造解析

コウジカビ *Aspergillus oryzae* が産生する RNA 分解酵素 RNase T₁ は、RNA のグアニン塩基 3'側を特異的に切断する極めて高い特異性を有する。RNase T₁ は、温和な条件下でヨード酢酸処理することにより、活性残基の Glu58 だけがカルボキシメチル (CM) 化され、触媒活性を失うとともに熱安定性が上昇する。筆者は、X 線結晶構造解析により、CM-RNase T₁ と 2'-GMP との複合体の立体構造を決定し、その不活性化と熱安定性獲得のメカニズムを構造学的に明らかにした。

2. ニトロ還元酵素 NfsA の構造機能相関解析

ニトロ還元酵素は広範な種類の芳香族ニトロ化合物を還元、分解する酸化還元酵素である。芳香族ニトロ化合物には爆薬、農薬、染料、色素など人間の活動により自然界に排出される環境汚染物質が多く、ニトロ還元酵素を用いたバイオレメディエーションが注目されている。

大腸菌由来のニトロ還元酵素 NfsA は NADPH を特異的に電子供与体とし、活性中心に補酵素 FMN を含有する。筆者らは、NfsA の結晶構造を決定した (図 1A)。NfsA と NADPH の結合モデルを考えると、フレキシブルなループ構造が NADPH のリン酸基と相互作用することが示唆された (図 1B)。このループに含まれる正電荷をもつアミノ酸残基 Arg²⁰³ と Arg²⁰⁸ をアラニンに置換した変異体を作製し、比活性を測定した結果、R203A 変異体は NADPH に対する親和性を失い、NfsA の NADPH 選択性は Arg²⁰³ 残基によることが強く示唆された。

3. フラビン還元酵素 FRaseI の構造機能相関解析

フラビン還元酵素は電子供与体として NADH または NADPH を用い、FMN などのフラビン化合物を還元する酵素である。特に、発光細菌においてフラビン還元酵素の生成物で

ある FMNH₂ が、発光酵素ルシフェラーゼの基質になることから、発光メカニズムの解明、および発光反応を利用した高感度分析への応用面で興味もたれる。海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* のフラビン還元酵素 FRaseI は ping pong bi bi 反応機構により、補酵素 FMN を介した NAD(P)H から FMN への電子伝達を触媒する酸化還元酵素である。

筆者らは、FRaseI の結晶構造を 1.8Å 分解能で決定した (図 2A)。FRaseI はダイマー構造をとり、補酵素 FMN はダイマーの間に挟まれる形で両方のプロトマーの残基と多くの水素結合や疎水相互作用により安定化されていた。構造から、活性中心の補酵素 FMN とフレキシブルなドメインに挟まれた領域に基質が結合するが、補酵素 FMN の裏側は完全にタンパク質で覆われており、ポケットの大きさから基質の NADH と FMN が同時に結合することは不可能であった。このことは本酵素の触媒反応が ping pong bi bi 反応機構に従うことと一致した。また、筆者らは阻害剤である dicoumarol などとの複合体の構造解析により、クマリン環が FMN のイソアロキサジン環とその

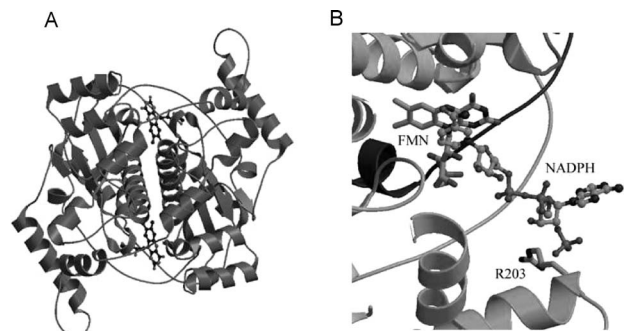


図 1 NfsA の立体構造

A. 全体構造。補酵素 FMN は ball and stick モデルで表した。B. NADPH 結合モデル。FMN, Arg²⁰³ 残基は stick モデル, NADPH は ball and stick モデルで表した。

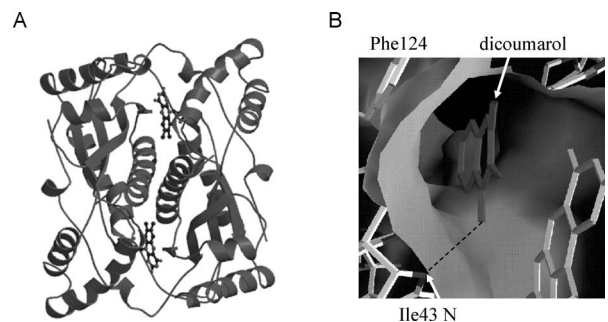


図 2 FRaseI の立体構造

A. 全体構造。補酵素 FMN は ball and stick モデルで表した。B. FRaseI と dicoumarol の複合体構造の dicoumarol 結合領域。予想される水素結合を黒の点線で示した。

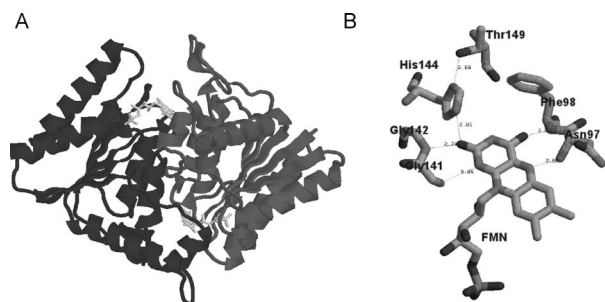


図3 AzoRの立体構造。

A. 全体構造. 補酵素であるFMNはstickモデルで表示した。B. FMNのイソアロキサジン環O2位の互変異性に関与する水素結合. イソアロキサジン環O2位の互変異性に関与するアミノ酸残基, およびFMNをstickモデルで表示し, 水素結合を点線で表示した。

近傍のPhe124の芳香環とによるスタッキング相互作用で安定化されることに加えて, クマリン骨格のC4位の水酸基とIle43のアミド窒素との1本の水素結合が重要であることを明らかにした。これらの阻害剤がNAD(P)Hの競争阻害剤であることと, サブポケットの大きさを考慮すると, NAD(P)Hの酸化還元部位であるニコチン環がこの領域に結合するという基質結合モデルを提唱することができた(図2B)。

4. 環境汚染物質分解酵素の構造機能相関解析

1) アゾ還元酵素 AzoR の構造機能相関解析

アゾ化合物は, 製造が容易で安定なことから, 印刷, 染色, 着色料, 化粧品などさまざまな用途で大量に使用されている合成色素である。だが, その安定性のため一度環境中に放出されると自然界の浄化作用では分解されず環境汚染や遺伝子変異を引き起こす。AzoRは, アゾ化合物を分解する微生物のスクリーニングの過程で, 有害性かつ汎用性の高いメチルレッドを分解する酵素として同定された大腸菌由来の酵素である。AzoRはNADHを特異的に電子供与体とし, FMNを補酵素としてping pong bi bi機構によりアゾ基を還元分解する酸化還元酵素であり, メチルレッドのほか, エチルレッドも還元分解する。

筆者らは, X線結晶構造解析によってAzoRとFMNとの複合体の立体構造を原子レベルで解明した。AzoRは, 活性中心が二つのプロトマーからのアミノ酸残基によって形成されることから, ホモダイマーで機能発現する酵素であることが判明した(図3A)。本酵素の活性中心において, FMNのイソアロキサジン環O2位は144 His NE位と水素結合を形成しており, このNE位上の水素イオンがイソアロキサジン環O2位に結合することが考えられた。つまり, AzoRの結晶構造から, AzoRの2電子転移の反応機構は互変異性を伴ったものであることが示唆された(図3B)。FMNのイソアロキサジン環とアミノ酸残基との水素結合の様式の違いにより, ハイドライドイオン転移の効率が違うことが報告されている。したがって, これらの成果は, タンパク質工学を利用した高効率な環境汚染物質分解酵素のデザインや開発へとつなげることを可能とした。

2) 脱硫酵素 DszB の構造機能相関解析

化石燃料の燃焼によって放出される硫黄酸化物は酸性雨など環境問題を引き起こす。石油に含まれる有機硫黄化合物の大半はジベンゾチオフェン(DBT)を基本構造とし, その分解が困難であるため, DBT分解系の研究が進められている。土壌細菌

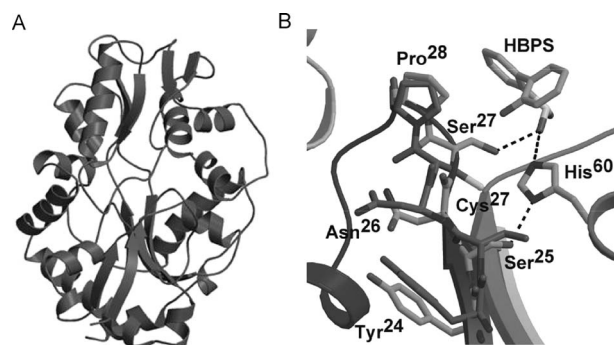


図4 DszBの立体構造。

A. 全体構造. B. 基質HBPSとの結合によるコンホメーション変化. 非結合状態のアミノ酸残基を濃いグレー, 基質結合状態のアミノ酸残基を薄いグレーで表示し, 水素結合を点線で表示した。

Rhodococcus erythropolis の *dszABC* オペロンはDBTをヒドロキシビフェニルに分解する過程で硫黄を亜硫酸として脱硫する酵素群である。 *dszABC* 遺伝子がコードするタンパク質のうち, DszAとDszCはモノオキシゲナーゼであり, フラビン還元酵素から供給される還元型FMNを用い, DBTを2-(2'-hydroxyphenyl)benzene sulfinate (HBPS)まで酸化する。HBPSは芳香族スルフィン酸加水分解酵素であるDszBにより亜硫酸と2-hydroxybiphenyl (HBP)に加水分解される。

筆者らは, 脱硫反応の最終ステップを担うDszBの結晶構造を決定した(図4A)。全体的な構造としてDszBは, 二つの α/β ドメインからなる楕円体の形をしている。この構造はABCトランスポータの基質結合タンパク質(SBP)ファミリーでよく見られる構造であり, DALI検索でも硫酸結合酵素とその立体構造が類似していることがわかった。DszBの推定活性中心はSBPと同様, 二つの α/β ドメインの間に存在することからDszBはSBPと同じ祖先から進化したものと考えられる。DszBの構造では求核残基であるCys²⁷が塩基性のHis⁶⁰との相互作用により基質のスルフィン酸基を攻撃し, Arg⁷⁰残基は反応中間体の負電荷を安定化させるような反応機構が考えられた(図4B)。このような基質認識機構の解明によって, 比活性や熱安定性の改善への知見を得ることができ, 微生物による石油の脱硫の実用化につなげるのが可能となった。

本研究は, 東京大学生物生産工学研究センター生物構造工学研究室および農学生命科学研究科食品工学研究室で行ったものであります。多大なご協力をいただいた永田宏次准教授, 佐々木 宏助手, ポスドク研究員, ならびに院生・学生・卒業生にお礼申し上げます。また, ご指導・ご鞭撻いただいた東京大学名誉教授・故 江橋節郎先生, 東京大学名誉教授・高橋健治先生, 高エネルギー加速器研究機構名誉教授・坂部知平先生, 長岡技術科学大学教授・故 三井幸雄先生に厚く御礼申し上げます。また, 共同研究者として, 多大なご協力をいただいた, 東京大学名誉教授・西郷 薫先生, 前橋工科大学准教授・善野修平先生, 岐阜大学工学部教授・北出幸夫先生, 松山大学薬学部准教授・中西雅之先生, 鳥取大学工学部教授・和泉好計先生, 味の素株式会社コーポレート理事・鈴木榮一郎博士に心から感謝いたします。また, その他多くの先生, 先輩, 同僚のご指導・ご鞭撻・ご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。