



Title	Biochemical and structural studies of multistep posttranslational modification system for a quinone cofactor- containing enzyme subunit
Author(s)	大関, 俊範
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82029
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (大関 俊範)

論文題名

Biochemical and structural studies of multistep posttranslational modification system for a quinone cofactor-containing enzyme subunit

(キノン補酵素含有酵素サブユニットの多段階翻訳後修飾機構の生化学的・構造生物学的研究)

論文内容の要旨

キノヘム蛋白質アミン脱水素酵素 (QHNDH) は、様々なグラム陰性菌において一級アミンの酸化的脱水素を触媒するヘテロ三量体酵素である (図1a)。活性中心を形成する最小の9-kDaサブユニットQhpCには、キノン補酵素であるシステイントリプトフィルキノン (CTQ) と分子内チオエーテル結合という2つのユニークな翻訳後修飾構造が存在する (図1b)。これまでの研究では、ラジカルSAM酵素QhpDが最初に細胞質内でQhpCのAsp/Glu残基とCys残基の間に3つの分子内チオエーテル結合を形成することが示されている。次に、CTQ形成の初期反応として、FAD依存性モノオキシゲナーゼQhpGが前駆体Trp残基の修飾に関与していることが推測されている。次に、

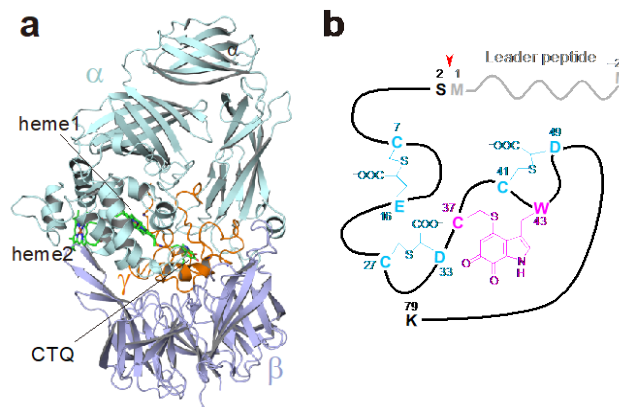


図1. QHNDHの結晶構造とQhpCの模式図

サブチリシン様セリンペプチダーゼQhpEは、QhpCのN末端28残基のリーダーペプチドを除去する。QhpEとQhpGについては、その特徴が詳細に解明されておらず、三次元構造も不明なままだった。そこで本研究では、QhpCの翻訳後修飾におけるQhpGとQhpEの役割に着目し、個々の酵素の詳細な反応機構を明らかにする。

まず、QhpGの触媒反応を同定するために、*Pseudomonas putida*からQhpC、QhpD、QhpE、QhpGの関連タンパク質を大腸菌発現系を用いて発現・精製した。インビトロ反応系を構築し、生成物であるQhpCを質量分析法で分析した。その結果、QhpDによってあらかじめ形成されたトリプルイントラペプチジルクロシリングを含むタンパク質基質QhpCにおいて、QhpGがCTQの前駆体であるTrp43の一回転ジヒドロキシル化を触媒することが明らかになった。興味深いことに、QhpDとQhpGの両方の反応には、QhpC/QhpD/QhpGの三元錯体形成が必須であることがわかった。このペプチジルトリプトファンジヒドロキシラーゼQhpGの結晶構造は、前駆体トリプトファンに近く位置する結合FADと架橋したQhpCをドッキングさせることができる大きなポケットを明らかにした。このドッキングモデルに基づいて、ペプチジルトリプトファンジヒドロキシ化はモノヒドロキシ化反応の繰り返しによって触媒されることが予測された。

また、*Ps. putida*由来のセリンプロテイナーゼQhpEについては、QhpCからリーダーペプチドを除去した際の速度論的解析から、QhpEは架橋構造を持つQhpCを架橋していない直鎖状のQhpCと比較して約50倍の速度で反応することが示された。おそらく、架橋形成によるQhpCの構造変化がQhpEの反応性に影響を与えていると考えられる。このように、QhpCは、QhpDとQhpGが反応した後も、QhpC/QhpD/QhpGの三元系複合体を維持している。その結果、直鎖状のQhpCではなく、架橋されたQhpCのリーダーペプチドをQhpEが効率的に三元系複合体から除去できることが示された。さらに、QhpEのX線結晶構造を1.80Å分解能で決定した。QhpEの活性中心には、QhpCが結合していると考えられる大きなポケットがあった。おそらく、このポケットが架橋したQhpCのコンパクトな構造を認識しているのではないかと考えられます。架橋されたQhpCに対するQhpEの反応性が高いことから、新たに翻訳された架橋されていないQhpCの切断を防ぎ、複合体形成によるQhpC生合成の進行を促進することが予想される。

このように、成熟したQhpCの生合成は、複数の酵素系が複合体の形成と各酵素の反応性を介して制御していることを示しました。これらの効率的かつ合理的なメカニズムは、炭素源のない飢餓条件下で一級アミンを同化する活

性QHNDHを迅速に生産するために必要不可欠であると考えられる。

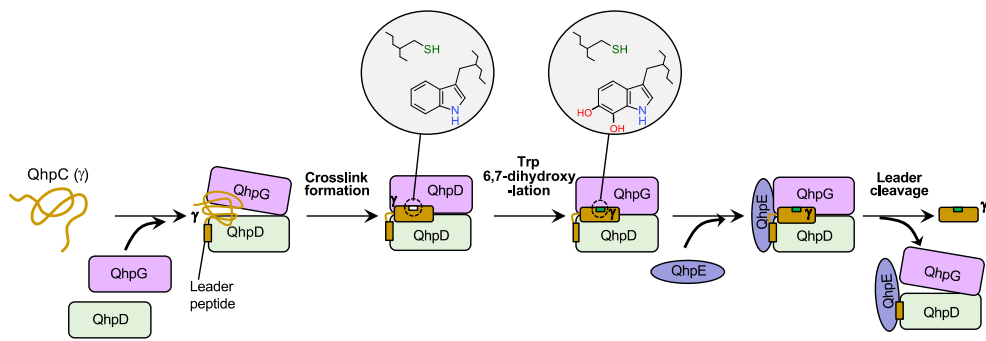


図2. 予想されるQhpCの翻訳後修飾機構

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 関 俊 範)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 黒田 俊一
	副 査	教授 中川 敦史
	副 査	教授 栗栖 源嗣
	副 査	准教授 岡島 俊英

論文審査の結果の要旨

様々なグラム陰性細菌に存在するキノヘムタンパク質アミンデヒドロゲナーゼは、 $\alpha\beta\gamma$ ヘテロ三量体構造を有している。その最小の γ サブユニット (QhpC) は、Trp 残基と Cys 残基の翻訳後修飾により形成される共有結合型キノン補酵素システイントリプトフィルキノン (CTQ) を含有するとともに、Asp/Glu 残基と Cys 残基の間で3ヶ所の分子内チオエーテルによって架橋されており、極めてユニークな構造を有している。本論文では、その補酵素 CTQ 形成を始めとする QhpC の翻訳後修飾がどのようなメカニズムで起きるのか、その修飾酵素の生化学的、構造生物学的研究によって解析している。

3つの修飾酵素 QhpD, QhpG, および QhpE の作用によって、QhpC が形成されていることがこれまでに判明していたが、立体構造を含めその反応機構の詳細は解明されていなかった。申請者は QhpG と QhpE の高分解能 X 線結晶構造解析を行なうとともに、その反応機構を解明した。QhpG では詳細な質量分析の結果、QhpG が触媒する反応の実体が、CTQ 前駆体の Trp 残基の二重水酸化反応であることを同定した。また、安定同位体で標識した $H_2^{18}O$ を用いた反応物解析に基づいて、酸化反応の酸素原子が分子酸素に由来することを解明した。加えて、QhpD による架橋形成と QhpG 水酸化反応が QhpC/QhpD/QhpG の三重複合体の中で起きることを解明した。決定した構造をもとに、架橋形成 QhpC と QhpG の複合体モデルを構築し、FAD との反応機構について合理的なモデルを提示することに成功した。

リーダーペプチドの切断に関わるセリンプロテアーゼ QhpE に関しては、架橋形成した QhpC において、未架橋の QhpC より優先的にリーダーペプチドを切断することを見出した。すなわち、QhpE が架橋構造を認識して、活性が制御されていることを明らかにした。決定した立体構造において、反応部位となる保存性基質ポケットの存在を見出すとともに、架橋を認識すると考えられる領域について推定し、活性制御のメカニズムを提示した。さらに、前述の3者複合体において、QhpC の架橋が形成されると、リーダーペプチドが露出して、QhpE が切断できる可能性も指摘した。このような架橋 QhpC に対する優先的な反応性は、QhpC の翻訳後修飾反応を効率的に進行させるために有効であると考えられる。

これらの研究成果は、QhpC の CTQ 形成ばかりでなく、他のペプチドの翻訳後修飾機構や、ビルトイン型補酵素と呼ばれるアミノ酸残基に由来する各種の補酵素形成機構の解明においても重要な知見を与えるものであり、学術的に高く評価できる。なお、予備審査において指摘された問題点についても、最終の業績発表会において適切に対応されていたことを申し添える。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。