

タンパク質のスワッピング機能および新規翻訳後修飾メカニズムの発見

このたび、筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻の小林達彦教授、周哲敏研究員、橋本義輝講師らの研究グループは、タンパク質のスワッピング機能および新規翻訳後修飾メカニズムを発見しました。

本研究グループは、アクリルアミド^{注1)} およびニコチンアミドを工業的に生産しているロドコッカス属放線菌^{注2)} の酵素ニトリルヒドラターゼ^{注3)} の生成機構を研究している過程で、2つのコンポーネントから構成される本酵素の片方のコンポーネントが他のタンパク質複合体の同一コンポーネントと置き換わる（スワッピングする）ことで酵素が活性を示す現象を初めて発見しました。アミノ酸配列が完全に同じタンパク質コンポーネント同士が互いに入れ替わる現象はこれまで前例が無く、かつ、タンパク質の翻訳後修飾^{注4)} 機構における初めての例でもあります。

また、この方法による酵素の活性化は酵素の修復にも適用可能であり、本酵素による有用物質工業生産上のリサイクル面でも応用的に重要であります。

研究の背景

小林教授らが以前から研究を進めているロドコッカス属放線菌の酵素ニトリルヒドラターゼは現在、紙力増強剤など様々な用途があるアクリルアミドやビタミンの一つであるニコチンアミドを工業生産している実用酵素です。特に、アクリルアミドは世界で50万トン以上生産されており、その約3分の1は本菌のニトリルヒドラターゼによるものです。本法は山田秀明京大名誉教授を中心とした研究グループが開発した日本発のバイオ法ですが、日本のみならずフランスやアメリカでも本菌の酵素で工業生産が行われています。ニトリルヒドラターゼは、コバルト (Co) を活性中心に含む金属酵素であり、コバルトに配位結合^{注5)} している3つのシステイン残基の内、2つは翻訳後修飾を受け酸化システイン^{注6)} に変換されています。

研究の結果

本研究グループは今回、ニトリルヒドラターゼを対象とし、新規な翻訳後修飾メカニズムを発見しました。また、その翻訳後修飾メカニズムの主役となるタンパク質複合体を同定することに成功しましたので、以下に説明させていただきます。

工業菌であるロドコッカス属放線菌の低分子量型ニトリルヒドラターゼ (NHase) の大量生産を行うべく、(本酵素を構成する β と α サブユニット^{注7)} の構造遺伝子である) *nhlB* と *nhlA* 遺伝子のみをロドコッカス属宿主に導入し発現^{注8)} を試みましたが、コバルトがほとんど含まれない活性の低い酵素 (アポ酵素^{注9)}) が生成しました【図1】。

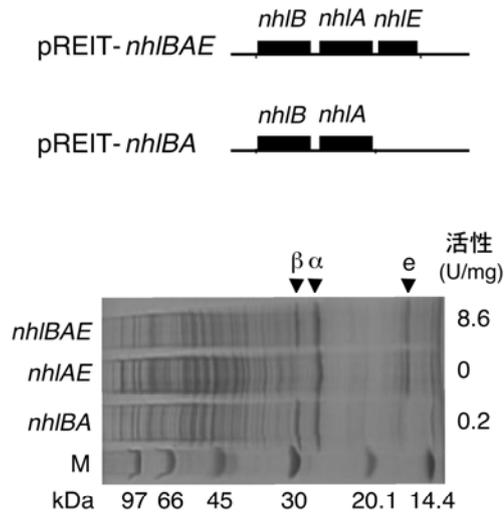


図1 ニトリルヒドラーゼ遺伝子 (*nhlB*, *nhlA*) 群の遺伝子構成 (上図) および発現の電気泳動解析 (下図)

そこで遺伝子構造上、*nhlB* と *nhlA* 遺伝子のすぐ下流にある *nhlE* 遺伝子も一緒に宿主に導入したところ、コバルトを含む高活性の酵素 (ホロ酵素^{注9)}) が生成しました。このホロ酵素は、元々の菌が持つ酵素と同じ性質を示し、2個の α サブユニットと2個の β サブユニットから構成されていました。従って、高活性のNHaseの生成には、 α と β サブユニットの発現のみならず NhlE タンパク質 (以下、e タンパク質とも記載) が重要な役割を果たすことが示唆されました。

e タンパク質の精製を試みたところ、NHase の α サブユニットとの複合体 [αe_2] として得られ、複合体中の α サブユニットはコバルトを含んでいました。この αe_2 複合体を上記アポ酵素に添加した結果、(コバルトを含む) ホロ酵素に変換されました。それではホロ酵素はどのようにしてコバルトを獲得したのでしょうか? αe_2 複合体からコバルトだけがアポ酵素に受け渡されたのか、それとも、 αe_2 複合体の (コバルトを含む) α サブユニット部分がアポ酵素の (コバルトを含まない) α サブユニットと置き換わったのでしょうか? この疑問に答えるために本研究グループは、NHase の α サブユニットの (アミノ末端から) 3番目のアミノ酸であるアラニングリシンに置換した変異アポ酵素を部位特異的変異法^{注10)}で作成し、これに (コバルトを含む) α サブユニットの3番目のアミノ酸がアラニンのままである αe_2 複合体を添加することで得られた (コバルトを含む) ホロ酵素のアミノ酸配列を調べました。その結果、3番目のアミノ酸はアラニンであることが分かり、 αe_2 複合体の α サブユニット部分がアポ酵素の (コバルトを含まない) α サブユニットと置き換わる (スワッピングする) ことが明らかとなりました【図2】。



図2 セルフサブユニットスワッピング

また、コバルトに配位しているシステイン残基を調べたところ、(コバルトを含む) αe_2 複合体の α サブユニットでは酸化システインに変換されており、スワッピングによりコバルトだけでなく酸化システインも αe_2 複合体からホロ酵素へ導入されることが分かりました。

以上の結果より、アポ酵素のサブユニットが翻訳後修飾を受けるのではなく、修飾されたサブユニットとアポ酵素のサブユニットがスワッピングすることでホロ酵素が生成することが明らかとなりました。このような新規かつ大変興味深いスワッピング機能をつかさどるタンパク質は e タンパク質が世界で最初であります。また一般的に、これまで知られている翻訳後修飾は、元々あったタンパク質に修飾がなされるのに対し、本研究グループの今回の発見は、元々あったタンパク質が修飾されたタンパク質と置き換わることで修飾を受けるという翻訳後修飾の初めての例でもあります。 αe_2 複合体の α サブユニットとアポ酵素の α サブユニットを区別するためにたった 1 つのアミノ酸変異を導入することで初めてスワッピングによる翻訳後修飾の解明につながりましたが、(α サブユニットのアミノ酸配列は両者で完全に同一であるため) このわずかな違いがなければ翻訳後修飾前後のサブユニットを区別することができません。これまで多くの翻訳後修飾が報告されていますが、それらの中にも今回発見した新しい概念であるスワッピングによる翻訳後修飾の例が見つかるかも知れません。

本研究グループはさらに、NHase の β サブユニットの (アミノ末端から) 52 番目と 157 番目のアミノ酸であるアルギニンをそれぞれアラニンに置換した変異アポ酵素を部位特異的変異法で作成し、得られた変異アポ酵素と αe_2 複合体間では α サブユニットのスワッピングが起こらないことから、(α サブユニットの) コバルトに配位している 2 つの酸化システイン残基と (β サブユニットの) 両アルギニン残基との間で各々塩橋^{注1)}を形成する静電引力が、e タンパク質がスワッピングを引き起こす駆動力として重要であることを明らかにしました【図3】。

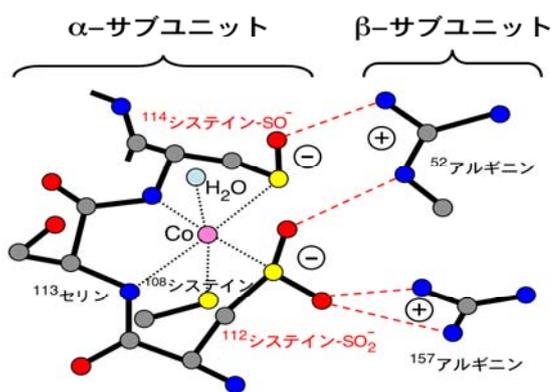


図3 活性中心のコバルトに配位する酸化システイン残基とアルギニン残基の間の塩橋

NHase を有用アミド生産に使用する上で、(活性を失った) アポ酵素が生成した場合、 αe_2 複合体と混合するだけで (活性のある) ホロ酵素に変換し得ることから、NHase の修復に本現象の利用が期待されます。

これらの成果は、2008年9月15日から19日の間のいずれかの日に発行の米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences, USA [PNAS]) 電子版に掲載されます。

Z. Zhou., Hashimoto, Y., Shiraki, K. and Kobayashi, M. "Discovery of post-translational maturation by self-subunit swapping" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2008).

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA [PNAS]

<http://www.pnas.org/>

本件の発表者

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 教授
小林 達彦 (こばやし みちひこ)

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 講師
橋本 義輝 (はしもと よしてる)

取材に関する窓口

筑波大学広報室 報道係

TEL 029-853-2040

○ 用語解説

注1) アクリルアミド

アクリルアミドは単量体であり、重合すると高分子化合物であるポリアクリルアミドになる。ポリアクリルアミドは水溶性合成樹脂の一種として、主に原油の回収剤・紙力増強剤・廃水処理用の凝集剤として用いられる他、塗料や接着剤等、広い用途がある。また、水溶液中で重合させたポリアクリルアミドゲルは電気泳動 (PAGE) 等に用いられる。

注2) ロドコッカス属放線菌

ロドコッカス属微生物はDNAのGC含量が高いグラム陽性菌であり、ストレプトマイセス属微生物と同様に放線菌群に属し、有用物質を生産する微生物としてだけでなく、近年、芳香族化合物・複素環化合物・塩素系化合物に対し高い分解活性を示す微生物として知られている。

注3) ニトリルヒドラターゼ

ニトリル化合物 ($R-CN$) を水和シアミド ($R-CONH_2$) に変換する反応を触媒する酵素。本酵素を用いたアクリルアミドの工業生産は、大量生産型化成品の世界で初めて例である。

注4) 翻訳後修飾

DNAからメッセンジャーRNAに転写された核酸塩基の配列情報を基に、タンパク質が合成されることを翻訳と言うが、タンパク質が合成された後に、タンパク質の化学的な構造変換 (修飾) が起こる場合があり、これを翻訳後修飾と言う。タンパク質のアミノ酸のリン酸化・糖鎖修飾・脂質修飾等だけでなく、ジスルフィド結合形成やペプチド結合の分解のような構造変換などがある。これらの修飾によって、タンパク質の機能・細胞内での局在・細胞外への分泌等が制御されている。

注5) 配位結合

結合を形成する2つの原子の一方からのみ結合電子が分子軌道に提供される化学結合。

注6) 酸化システイン

システインスルフィオン酸 ($Cys-SOOH$) やシステインスルフェン酸 ($Cys-SOH$)。

注7) サブユニット

他のタンパク質と会合して多量体タンパク質やオリゴマータンパク質を形成する単一のタンパク質分子。

注8) 発現

遺伝子の情報が細胞における構造および機能に変換される過程を言う。具体的には、遺伝情報に基づいてタンパク質が合成されることを指す。

注 9) アポ酵素とホロ酵素

酵素にはタンパク質部分だけでは十分な酵素活性を示さず、非タンパク質性の分子（補因子）の助けが必要なものがある。酵素本体となるタンパク質分子に補因子が結合して初めて酵素として機能するものをホロ酵素と呼ぶのに対し、（補因子を失い）タンパク質部分のみの状態のものをアポ酵素と言う。

注 10) 部位特異的変異法

遺伝子組換え技術により、クローニングした遺伝子の特定の部位に塩基置換・挿入・欠失等の変異を導入する方法。この方法を用いることで、目的遺伝子にコードされているタンパク質に対し、特定のアミノ酸の置換等の改変を自由に行うことが可能。

注 11) 塩橋

酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の側鎖間に働く静電的相互作用によって作られた結合。