

キノン補酵素形成に関わる新奇フラビン酵素の構造と機能

中井 忠志¹, 岡島 俊英²

1. はじめに

タンパク質は、自身を構成するアミノ酸残基のみでは発揮できない機能を獲得するために、各種の金属イオンや低分子有機化合物を補因子として取り込んでいる。このような機能拡張の手段の一つとして、タンパク質の翻訳後修飾がある。とりわけ、アミノ酸残基から、酵素の反応部位となる補酵素を作り出す翻訳後修飾は重要である^{1,2)}。本稿では、細菌のキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (quinohemoprotein amine dehydrogenase: QHNDH) (図1A) に存在する酸化還元補酵素システイントリプトフィルキノン (cysteine tryptophylquinone: CTQ) の生合成機構に着目する³⁾。CTQは、Trp残基がチオエーテル結合によってCys残基と架橋され、さらにその側鎖インドール環がオルトキノン化されている (図1B)。私どもの最新の研究成果として、その翻訳後修飾に関与する新しく奇異なフラビン酵素の構造と反応の一端が判明したので、関連の研究と合わせて紹介したい⁴⁾。

2. 背景

QHNDHは数多くのグラム陰性細菌のペリプラズムに生成する誘導酵素であり、 $\alpha\beta\gamma$ の三つの異なるサブユニットから構成される^{5,6)}。本酵素は、一級アミン類のアルデヒドへの酸化反応を触媒することでエネルギー源として資

化する役割を有している。X線結晶構造によると^{5,6)}、最小の γ サブユニットには二つの特殊な翻訳後修飾構造が含まれている。その一つは3か所のチオエーテル分子内架橋であり (図1B)、Cys残基側鎖とAsp/Glu残基側鎖の間に形成されている。もう一つが補酵素CTQであり、*Pseudomonas putida* QHNDHではCys37とTrp43とで構築されている。複雑な架橋構造は、多段階の翻訳後修飾機構の存在を示すものであった。

一般的に、酵素機能に関連した遺伝子はオペロンを形成し、構造遺伝子に加え、翻訳後修飾酵素遺伝子もその中に存在することが多い。ゲノム解析の結果、QHNDHをコードする*qhp*オペロン (*qhpABCDEFGR*) が同定され、共通した修飾酵素遺伝子が構造遺伝子と共在することが判明した³⁾。このうち $\alpha\beta\gamma$ サブユニットをコードする構造遺伝子はそれぞれ*qhpA*、*qhpB*、および*qhpC*であり、*qhpR*はオペロンの転写調節因子であった。これまでに、QhpC (γ サブユニット) は、成熟型酵素には存在しないN末端側28残基のリーダー配列が付加された状態で翻訳された後に、ラジカルS-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM) 酵素QhpDがQhpC内の3か所のCys-Asp/Glu間チオエーテル架橋形成を行うことが判明している⁷⁾。さらに、セリンプロテアーゼQhpEが、この架橋済みQhpC (以下、架橋QhpCと略称) からリーダーペプチドを切断除去した後、QhpCはABCトランスポーターQhpFによって細胞質からペリプラズムへ輸送されると考えられた³⁾。QhpGはフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 依存性モノオキシゲナーゼと配列相同性を示し、その遺伝子破壊株ではキノンのない不活性型QHNDHが形成された³⁾。CTQ形成に関与することが予測されたが、QhpGの機能は長らく不明であった³⁾。

3. フラビン酵素QhpGの役割と機能

まず、*qhpG*欠損株から得られた不活性型QHNDHに含まれる γ サブユニットを単離・解析した。その結果、 γ サブユニットには、三つのCys-Asp/Glu間の架橋が形成されていたものの、CTQ前駆体であるCys残基とTrp残基には何も修飾がないことがわかった⁴⁾。すなわち架橋QhpCがQhpGの直接の基質であることを示唆した。一方、*P. putida*に由来するQhpGを、大腸菌発現系を用い酸化型FADが

¹ 広島工業大学生命学部食品生命科学科 (〒731-5193 広島県広島市佐伯区三宅2-1-1)

² 大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ケ丘8-1)

Structure and function of a novel flavoenzyme involved in quinone cofactor biogenesis

Tadashi Nakai¹ and Toshihide Okajima² (¹Graduate School of Science and Technology, Hiroshima Institute of Technology, 2-1-1 Miyake, Saeki-ku, Hiroshima 731-5193, Japan, ²Department of Biomolecular Science and Reaction, Institute of Scientific and Industrial Research (SANKEN), Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940092

© 2022 公益社団法人日本生化学会

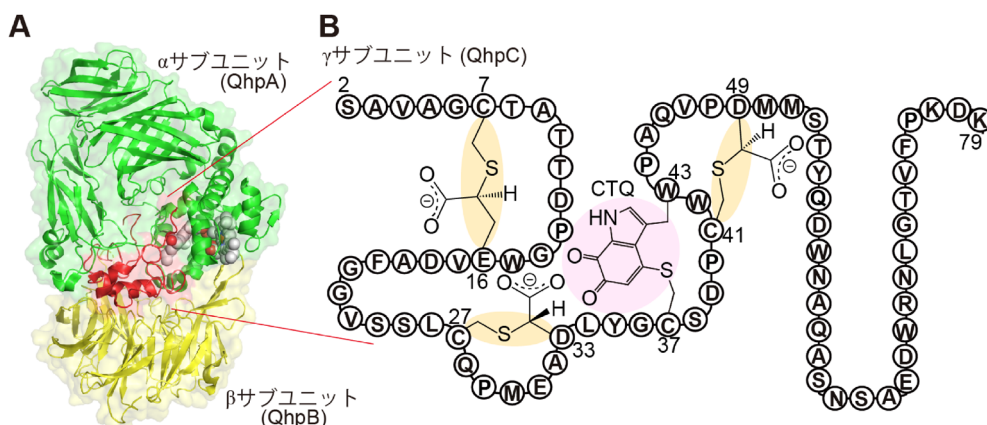


図1 キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の構造

(A) *Pseudomonas putida*由来のキノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の立体構造 (PDB entry ID: 1JMX) のリボンモデル. α サブユニットに結合する2分子のヘムは球モデルで示した. (B) 翻訳後修飾による2種類の特徴的な化学構造. γ サブユニット (QhpC) 内の3か所のチオエーテル架橋をオレンジ, 補酵素CTQをピンクの背景で示した.

結合した状態で調製することができたので, 基質となる架橋QhpCを準備して, その機能を調べることにした⁴⁾. 共発現系を用いてQhpC・QhpD複合体を調製し, 他のラジカルSAM酵素の反応と同様に, 嫌気条件下でQhpC内に3か所のCys-Asp/Glu間架橋を形成させた^{4, 8)}. このとき, 等モルのQhpGを共存させると, 三つの架橋形成反応が完結するが, QhpGが存在しないと, その反応は一部しか進行しないことが判明した. この結果は, QhpC・QhpD複合体とQhpGとが3者複合体を形成しており, QhpGがタンパク質間相互作用を介してQhpDの架橋形成反応を促進していることを示すものと考えられた.

多くのFAD依存性モノオキシゲナーゼの触媒反応では, まずFADがNADPHによって還元され, さらに酸素分子と反応し, 基質と直接反応するC4a-hydroperoxy中間体が形成される⁹⁾. しかしながら, QhpGに結合したFADはNAD(P)Hなどの生理的還元物質によって還元されず, *qhp*オペロン内にもFAD還元酵素は含まれていない. 唯一, 人為的な還元剤 (亜ジチオン酸ナトリウム) による還元のみが可能であった⁴⁾. そこで, 架橋QhpC・QhpD・QhpGの3者複合体において, 嫌気条件下でFADを還元した後, 過剰量の酸素と反応させた. 反応物をAsp-Nプロテアーゼで消化して, 質量分析した. その結果, 未反応と比較して, CTQ前駆体Trp43残基を含むペプチドの質量が約32 (酸素2原子相当) 増加することが見いだされた. さらに, 単離した架橋QhpCとQhpGを反応させても, 架橋QhpCはQhpGと強く結合するものの, 32の質量増加はまったくみられなかった. この結果は, Cys-Asp/Glu間架橋形成反応と同様に, QhpG反応においても3者複合体の形成が重要であることを示している. 質量増加がみられたペプチドの解析を進めた結果, Trp43に2個の酸素原子が導入されていることが明らかになった (図2A). QhpGの反応によ

って最終的なCTQは形成されておらず, QhpGは架橋QhpCのTrp43に二つの水酸基を同時に導入するユニークな活性を持つと結論できた⁴⁾.

4. QhpGの結晶構造

さらに詳細なQhpGの機能解明のために, X線結晶構造解析を行った. 得られた構造は, N末端側の大きな触媒ドメインとC末端側の小さなwinged-helix (WH) ドメインで構成されていた (図3A)⁴⁾. FADは触媒ドメイン内部に結合していた. 触媒ドメインとWHドメインに囲まれた大きな空間があり, その空間に面した触媒ドメイン表面からFADイソアロキサジン環の*re*面へ伸びる深くて狭いチャンネルが存在していた. この*re*面チャンネルが基質結合部であると推定して, 架橋QhpCとの複合体モデルを構築した. 架橋QhpCのCys37とTrp43の間にはチオエーテル結合がないので (図2A), Asp39-Met51 ループは可動性が高く, この部分に大きな構造変化を導入することがモデル構築には必要であった (図3B)⁴⁾. モデルは, 触媒ドメインとWHドメインに囲まれた領域が大きなポケットとして架橋QhpC全体と相互作用し, *re*面チャンネルの底部でQhpCのTrp43とFADイソアロキサジン環とが近接しうること示した. *re*面チャンネルの入り口付近に保存性の高い塩基性残基が複数存在するのに対し, γ サブユニットの底面には酸性残基が存在しており, モデルではちょうどこれらが静電的な相互作用をしていた.

5. QhpGの反応機構と3者複合体形成の意義

得られた複合体モデルを元にとすると, QhpGの触媒反応は, 基本的にFADイソアロキサジン環とそれに近接する

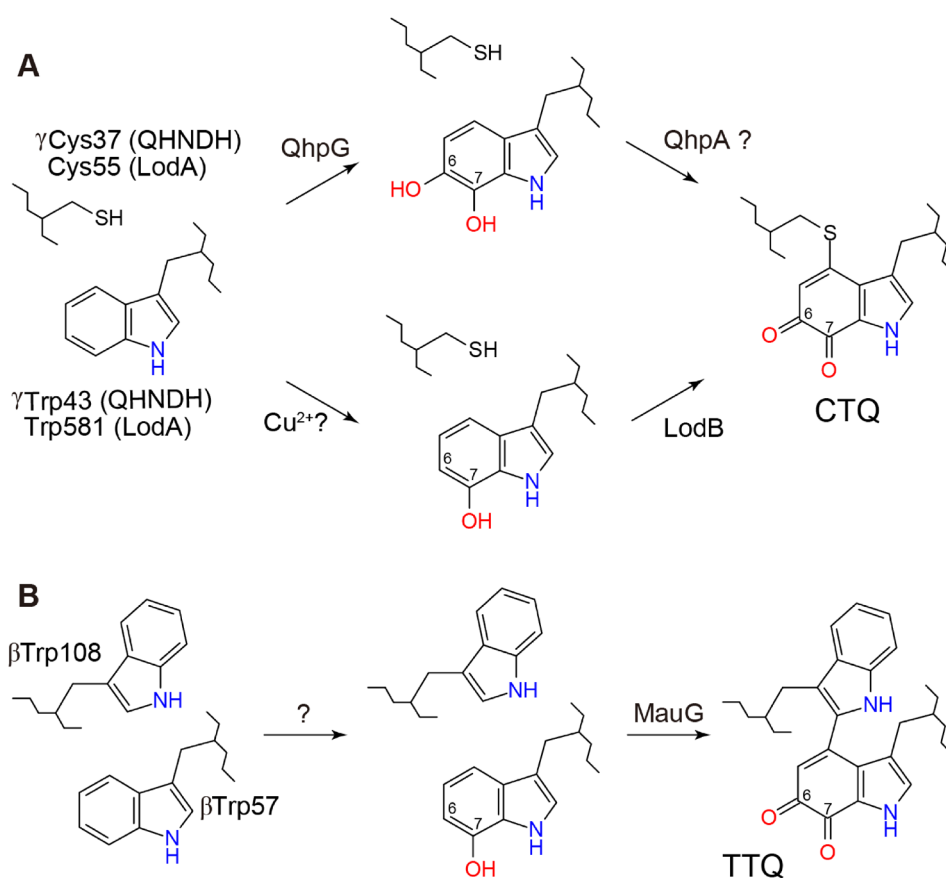


図2 補酵素CTQとTTQの化学構造と予測される合成経路

CTQ形成反応(A)は、QHNDHとL-Lys-ε-オキシダーゼ(LodA)について、TTQ形成反応(B)は、メチルアミン脱水素酵素(MADH)について示した。

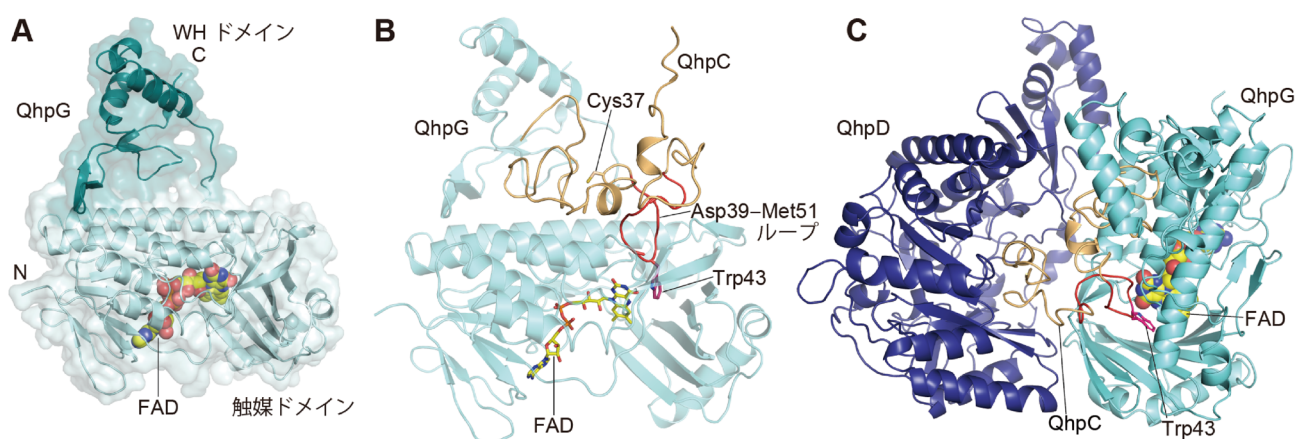


図3 QhpGの立体構造とQhpCおよびQhpDとの複合体モデル

(A) QhpGの結晶構造(PDB entry ID: 7CTQ)。触媒ドメインを淡い水色、WHドメインを濃い水色で示した。(B) QhpC・QhpG 2者複合体モデル。QhpGを水色、QhpCのAsp39-Met51ループを赤色、それ以外を橙色で示した。(C) QhpC・QhpD・QhpG 3者複合体モデル。QhpD(紺色)の立体構造はホモロジーモデルを用いた。QhpGとQhpCは(B)と同様に着色した。

Trp43インドール環との間で直接的に起きていると考えられた^{4, 10)}。前述したように、FADモノオキシゲナーゼに共通する反応中間体としてC4a-hydroperoxyが生成した後、

イソアロキサジン環に近接するTrp43インドール環との間に直接的な求電子置換反応が起こり、7位が水酸化される¹⁰⁾。次に、3者複合体は維持されたままTrp43インドー

ル環の位置がずれ、隣接の6位が水酸化されることにより、6,7-OH-Trp43が形成される（図2A）。なお、QhpGはグラム陰性細菌の細胞質内に存在し、QhpGによる修飾反応だけではCTQは完成しない。現時点の仮説として、修飾されたQhpCはある程度の立体構造を維持しつつABCトランスポーターのQhpFによりペリプラズムに輸送された後、ペリプラズム中でQHNDHの α サブユニットと結合し、そのヘム分子を介した酸化反応によりCys37-修飾Trp43間のチオエーテル結合とインドール環オルトキノンが最終的に生成され则认为している（図2A）³⁾。

QhpC・QhpD・QhpGの3者複合体形成の意義を考察するため、結晶構造が決定されていないQhpDのホモロジーモデルを作成し複合体モデルを構築した（図3C）。QhpDは全体としてボウル型の構造を有しており、そのくぼみに架橋QhpCが結合し、その反対側でQhpGが相互作用できることが予測された^{4,8)}。二つの酵素が、QhpCに対して、Cys-Asp/Glu間架橋形成反応とTrpの二水酸化反応を連続的かつ効率的に進行させることができる合理的な配置であった⁴⁾。おそらくは架橋形成される前のランダムコイルに近いQhpCの構造安定化をQhpGが担っているものと考えられる。架橋形成後には、QhpCのリーダーペプチドとQhpDとの相互作用によって、架橋QhpCは保持され、QhpGとの反応が可能になると考えられる。細胞内でのQhpGのFADの還元機構は不明であるが、一つの可能性として、QhpDの[4Fe4S]クラスターを介した電子移動が必要であるのかもしれない。

6. 他のTrpキノン酵素との関係性

長年CTQはQHNDHにのみ見いだされていた。しかし数年前、まったく異なる酵素のL-Lys- ϵ -オキシダーゼ（LodA）¹¹⁾やグリシンオキシダーゼ（GoxA）¹²⁾などのアミノ酸オキシダーゼ中にもCTQが存在することが明らかになった。これらの酵素は、QHNDHと配列相同性もなく、また、立体構造もまったく異なる。その一方で、それぞれに近接した遺伝子として、QhpGとも相同性を示すFAD依存性モノオキシゲナーゼLodB¹³⁾、GoxB¹⁴⁾がコードされており、CTQ形成に必須の役割を果たすことが報告された。しかし、LodBやGoxBの機能はQhpGと異なり、7-OH Trp残基を基質としてCTQ形成の完結までを触媒すると考えられている（図2A）。基質となる7-OH Trpの生成は、銅イオンが関与する自発的な反応によると推測されている（図2A）。これはQhpGが未修飾Trp残基を基質として二水酸化反応を連続して触媒するのと対照的である。さらに、GoxAのCTQは分子内部に埋もれた状態にあるので、GoxBの反応では、QhpGで推定された近接FADとの間の直接的な水酸化反応は起こりえず、GoxBのFADはGoxA

の7-OH Trpとの直接的な相互作用のない反応機構に従っていると考えられている¹⁴⁾。

一方、CTQに類似するTrp残基由来キノンを含む補酵素として、メチルアミン脱水素酵素（methylamine dehydrogenase：MADH）などに含まれるトリプトファントリプトフィルキノン（tryptophan tryptophylquinone：TTQ）がある（図2B）¹⁾。TTQは二つのTrp残基（MADHでは β サブユニットの β Trp57、 β Trp108）が架橋を形成し、前者がオルトキノン化されており、CTQと共通した構造を持つ（図2B）。興味深いことに、MADHのTTQ前駆体 β Trp108をCysに部位特異的に変異させると、わずかながらCTQが形成されることが報告されている¹⁵⁾。このことは、TTQ形成が少なくとも部分的にはCTQ形成と共通する化学反応に従っていることを示唆している。これまでに、2ヘムタンパク質のMauGとTTQ前駆体を含むMADHとの複合体の結晶構造とTTQ形成の最終段階の詳細な反応機構が解明されている¹⁾。それによると、MauGは、MADH分子内部の7-OH-Trp残基を、直接的な相互作用なしに遠隔電子移動によってTTQへと完全に変換する（図2B）。7-OH-Trp残基が基質となることは、LodAやGoxAと共通であるが、MauGは同じく2ヘムタンパク質でありCTQ形成を完結させると推定されるQHNDHの α サブユニットとも類似している。このように、Trp残基由来のキノン補酵素の生成機構は、個々の酵素ファミリーで“似て非なる”ものが並行的に存在していることになる。すなわち、（補）酵素の分子進化における収斂進化（convergent evolution）をきわめて明確に示しているといえる。

7. おわりに

タンパク質中に含まれるアミノ酸残基からキノン補酵素を作り出すために、このような複雑なシステムを構築することは生物にとって非常に手間やコストがかかる作業と考えられる。しかし、別な観点からみると、キノン補酵素形成にはコストに見合う重要性があるとも想像できる。Trp残基由来キノン補酵素形成の収斂進化も、キノン補酵素の機能的な重要性の証であるのかもしれない。

謝辞

本稿で紹介いたしました研究は、大阪大学産業科学研究所生体反応科学研究分野において実施されました。主要なデータは、大関俊範博士によって得られています。大阪大学産業科学研究所谷澤克行名誉教授には、本稿について貴重なアドバイスを頂戴いたしました。両先生を含む多数の共同研究者の方々に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Davidson, V.L. (2018) Protein-derived cofactors revisited: Empowering amino acid residues with new functions. *Biochemistry*, **57**, 3115–3125.
- 2) Kim, M., Okajima, T., Kishishita, S., Yoshimura, M., Kawamori, A., Tanizawa, K., & Yamaguchi, H. (2002) X-ray snapshots of quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 591–596.
- 3) Nakai, T., Deguchi, T., Frébert, I., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2014) Identification of genes essential for the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *Biochemistry*, **53**, 895–907.
- 4) Oozeki, T., Nakai, T., Kozakai, K., Okamoto, K., Kuroda, S., Kobayashi, K., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2021) Functional and structural characterization of a flavoprotein monooxygenase essential for biogenesis of tryptophylquinone cofactor. *Nat. Commun.*, **12**, 933.
- 5) Datta, S., Mori, Y., Takagi, K., Kawaguchi, K., Chen, Z.W., Okajima, T., Kuroda, S., Ikeda, T., Kano, K., Tanizawa, K., et al. (2001) Structure of a quinohemoprotein amine dehydrogenase with an uncommon redox cofactor and highly unusual crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14268–14273.
- 6) Satoh, A., Kim, J.K., Miyahara, I., Devreese, B., Vandenbergh, I., Hacisalihoglu, A., Okajima, T., Kuroda, S., Adachi, O., Duine, J.A., et al. (2002) Crystal structure of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. Identification of a novel quinone cofactor engaged by multiple thioether crossbridges. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2830–2834.
- 7) Ono, K., Okajima, T., Tani, M., Kuroda, S., Sun, D., Davidson, V.L., & Tanizawa, K. (2006) Involvement of a putative [Fe-S]-cluster-binding protein in the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13672–13684.
- 8) Nakai, T., Ito, H., Kobayashi, K., Takahashi, Y., Hori, H., Tsubaki, M., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2015) The S-adenosyl-L-methionine enzyme QhpD catalyzes sequential formation of intra-protein sulfur-to-methylene carbon thioether bonds. *J. Biol. Chem.*, **290**, 11144–11166.
- 9) Huijbers, M.M., Montersino, S., Westphal, A.H., Tischler, D., & van Berkel, W.J. (2014) Flavin dependent monooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **544**, 2–17.
- 10) Amaral, M., Levy, C., Heyes, D.J., Lafite, P., Outeiro, T.F., Giorgini, F., Leys, D., & Scrutton, N.S. (2013) Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition. *Nature*, **496**, 382–385.
- 11) Okazaki, S., Nakano, S., Matsui, D., Akaji, S., Inagaki, K., & Asano, Y. (2013) X-ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine ϵ -oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *J. Biochem.*, **154**, 233–236.
- 12) Andreo-Vidal, A., Mamounis, K.J., Sehanobish, E., Avalos, D., Campillo-Brocal, J.C., Sanchez-Amat, A., Yukl, E.T., & Davidson, V.L. (2018) Structure and enzymatic properties of an unusual cysteine tryptophylquinone-dependent glycine oxidase from *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. *Biochemistry*, **57**, 1155–1165.
- 13) Chacón-Verdú, M.D., Gómez, D., Solano, F., Lucas-Elío, P., & Sánchez-Amat, A. (2014) LdB is required for the recombinant synthesis of the quinoprotein L-lysine- ϵ -oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 2981–2989.
- 14) Mamounis, K.J., Ma, Z., Sánchez-Amat, A., & Davidson, V.L. (2019) Characterization of PlGoxB, a flavoprotein required for cysteine tryptophylquinone biosynthesis in glycine oxidase from *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 108–110.
- 15) Pearson, A.R., Jones, L.H., Higgins, L., Ashcroft, A.E., Wilmot, C.M., & Davidson, V.L. (2003) Understanding quinone cofactor biogenesis in methylamine dehydrogenase through novel cofactor generation. *Biochemistry*, **42**, 3224–3230.

著者寸描

●中井 忠志 (なかい ただし)



広島工業大学生命学部准教授。博士(理学)。

■略歴 2000年大阪市立大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。同年理化学研究所基礎科学特別研究員。03年日本学術振興会特別研究員(大阪大学)。05年理化学研究所研究員。07年日本学術振興会海外特別研究員(米国ワシントン大学)。09年大阪大学産業科学研究所助教

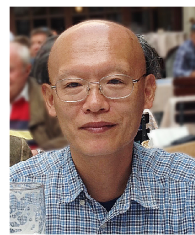
を経て17年より現職。

■研究テーマと抱負 複数の酵素により構成される生体システムの生化学・分子生物学的研究。生物が持つ巧妙な仕掛けを発見し、分子や原子のレベルで理解するとともに有用物質生産にも活かしたい。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/nakaix/>

■趣味 旅行、サイクリング。

●岡島 俊英 (おかじま としひで)



大阪大学産業科学研究所准教授。博士(理学)。

■略歴 1992年大阪大学大学院理学研究科修了(生物化学専攻)。同年近畿大学農学部助手。95年同講師。2000年大阪大学産業科学研究所助手。02年同助教授を経て07年同准教授。現在に至る。この間1998年から1年間米国カリフォルニア大学バークレー校およびスクリプス研究所

にて博士研究員。2010年から大阪医科薬科大学非常勤講師。

■研究テーマと抱負 キノン補酵素含有酵素の触媒機構と翻訳後修飾機構を、生化学的手法に構造生物学を組み合わせて解明することを研究テーマとしている。

■ウェブサイト <https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

■趣味 旅行、町歩き。