

令和 3 年 6 月 1 5 日
愛 媛 大 学
山 形 大 学
京 都 工 芸 繊 維 大 学

酵素のより原始的な祖先の姿が明らかに

～リクルート仮説を覆す酵素の分子進化の証拠を発見～

愛媛大学大学院農学研究科（沿岸環境科学研究センター教授 兼任） 渡辺 誠也教授、同左修士課程 2 年生（当時；現 天野エンザイム株式会社所属） 村瀬 陽介、同左助教（当時；現 山形大学学術研究院講師（理学部主担当）） 渡邊 康紀、京都工芸繊維大学 櫻井 康博研究員、同左 田嶋 邦彦教授の研究グループは、アコニターゼファミリーのタンパク質の中で唯一機能が不明だったアコニターゼ X において、最近その基質が明らかとなったシス-3-ヒドロキシ-L-プロリン脱水酵素とメバロン酸 5-リン酸脱水酵素の立体構造を、X 線結晶回折法により世界で初めて明らかにしました。

アコニターゼ X を除くアコニターゼファミリーに属する全てのメンバーは、祖先型遺伝子が重複しその後基質特異性が向上するという“酵素進化のリクルート仮説”で説明できる典型例とされてきました。今回決定されたアコニターゼ X の全体構造はこれら既知のメンバーと一部似ていましたが、活性中心に含まれる鉄硫黄クラスターや基質の結合様式は大きく異なっていました。こうした事実は、いままで考えられていたものよりさらに原始的な共通祖先の存在を連想させ、アコニターゼファミリーを含むタンパク質の分子進化に新たな知見を与えると期待されます。

本研究成果は、2021 年 6 月 7 日（月）午後 6 時（日本時間）に英国 Springer Nature Group が刊行する国際学術誌 Communications Biology (Nature Communications の姉妹誌) にオンライン掲載されました。

なお、本研究の一部は愛媛大学の農学研究科研究グループ ARG（生命機能科学応用開発グループ；グループ長 渡辺 誠也）の支援を受けて行われました。

つきましては、是非ご取材くださいますようお願いいたします。

記

掲載誌：Communications Biology **4**, 687 (2021)

題 名：Crystal structures of aconitase X enzymes from bacteria and archaea provide insights into the molecular evolution of the aconitase superfamily.

著 者：渡辺誠也 1, 2, 3*, 村瀬陽介 1#, 渡邊康紀 1, 2, 4, 櫻井康博 5, 田嶋邦彦 5

1 愛媛大学大学院農学研究科

2 愛媛大学農学部

3 愛媛大学沿岸環境科学研究センター

4 山形大学学術研究院

5 京都工芸繊維大学

* 責任著者 # 共筆頭著者

DOI：10.1038/s42003-021-02147-5

※ 送付資料 6 枚（本紙を含む）

本件に関する問い合わせ先

愛媛大学大学院農学研究科

（沿岸環境科学研究センター教授 兼任）

教授 渡辺 誠也

TEL：089-946-9848

Mail：irab@agr.ehime-u.ac.jp

【概要】

生命誕生初期の細胞が持っていた遺伝子（酵素）の数は現在よりはるかに少なく、単一の酵素で（構造がよく似た）複数の化合物を基質にできたと考えられます。その後、進化の過程で遺伝子の重複が起き、より限られた基質を使うようになりました。これは“酵素進化のリクルート仮説”と呼ばれています。実際、（同じ遺伝子を祖先に持つ）アミノ酸配列に相同性がある酵素は類似した機能や触媒反応様式を持ち、それぞれをサブファミリーとする大きなタンパク質ファミリーを形成することになります。

アコニターゼファミリーには、5種類のサブファミリーが存在しています（図 1a）。このうち、アコニターゼ（Acn）、ホモアコニターゼ（HACN）、イソプロピルリンゴ酸異性化酵素（IPMI）、2-メチルクエン酸脱水酵素（AcnD）の4種類（以下、アコニターゼ酵素と総称）については、触媒中心に3個のシステイン残基が配位した[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターを持ち、類似した構造を持つ基質のヒドロキシル基と特定の水素原子を取り出し立体化学的に異性化する反応を触媒します。すなわち、アコニターゼファミリーの分子進化は上記リクルート仮説で説明できる典型例であるといえます。これに対しアコニターゼX（サブファミリー）は、すでに知られているアコニターゼ酵素の活性が見られないだけでなくアミノ酸配列の相同性もほとんどないことから、2003年に遺伝子の存在が初めて報告されて以降、長い間“機能未知タンパク質”に分類されてきました。

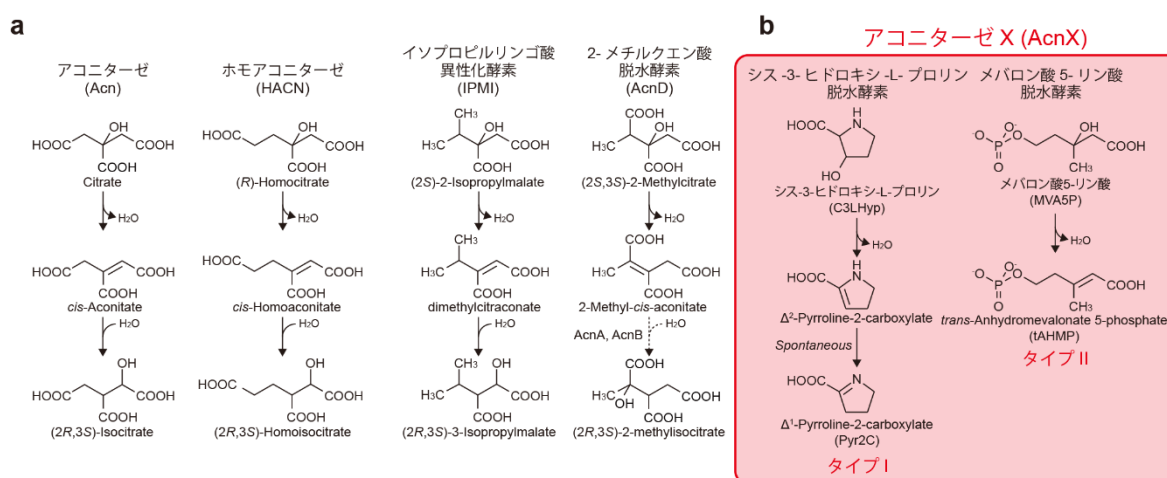


図 1. 既知のアコニターゼ酵素 (a) とアコニターゼ X (b) の触媒反応

アコニターゼXは、単一のポリペプチド鎖からなるタイプIと、大小サブユニットから成るタイプIIに大きく分けられます。2016年に渡辺教授らは、細菌の持つタイプI遺伝子がヒドロキシプロリン代謝遺伝子のクラスター内に見出されることに注目し、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン（C3LHyp）脱水酵素としての機能を初めて報告しました（図 1b）（参考文献 1）。さらに 2018 年には名古屋大学のグループにより、古細菌の持つタイプIIが特殊なイソプレノイド生合成系に關与するメバロン酸 5-リン酸（MVA5P）脱水酵素であるという報告がなされました（参考文献 2）。そこで今回、両酵素の基質認識および反応触媒機構を解明するために、X線結晶回折法による三次元立体構造解析を行いました。

植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* 由来のタイプ I 酵素（以下、AtAcnX）、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来のタイプ II 酵素（以下、TkAcnX）についてそれぞれ結晶化に成功、大型放射光施設スプリング 8 で回折データを収集し、最終的に 1.6 Å と 3.4 Å 分解能でアポ構造（酵素のみの構造）を決定しました。典型的なアコニターゼ酵素であるウシミトコンドリア由来アコニターゼ（以下、mAcn）と比較すると、全体構造の重ね合わせは困難である一方、4 個のドメインからなる点は共通しておりそれらの間では部分的な共通性が見られました。

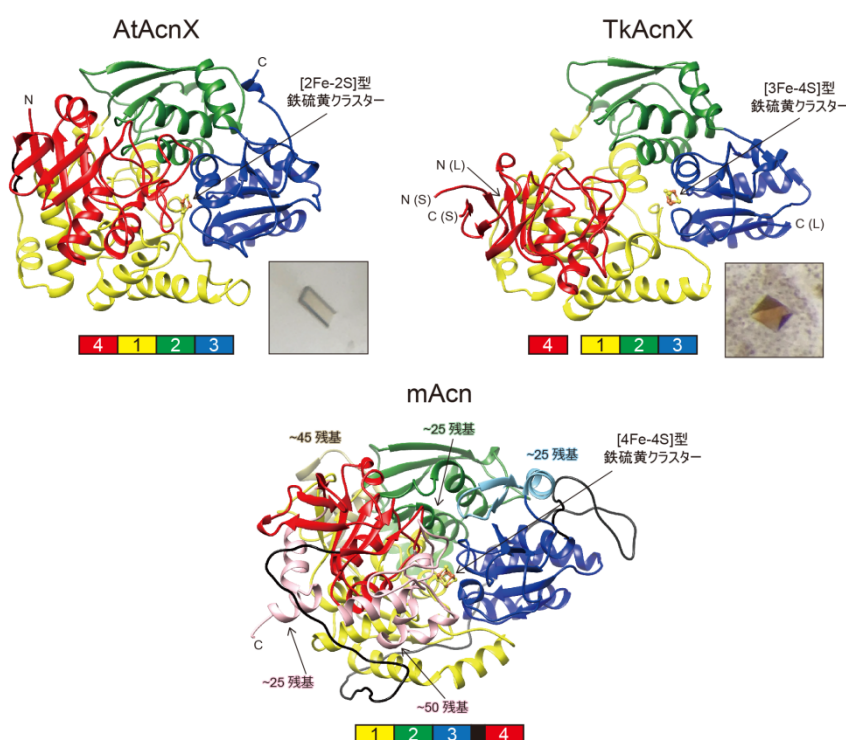


図 2. AtAcnX と TkAcnX の立体構造と mAcn との比較

いずれもドメイン 1（黄）、2（緑）、3（青）、4（赤）からなっており、TkAcnX ではドメイン 1-3 は大サブユニット（L）、ドメイン 4 は小サブユニット（S）として独立している。mAcn には、AcnX に見られない多くの挿入部分が存在する。

活性中心と推定される位置を見ると、TkAcnX では[3Fe-4S]型鉄硫黄クラスターが配位していました（図 3a）。これは[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターから 1 個の鉄原子が酸化で抜け落ちたものと考えられ、TkAcnX はアコニターゼ酵素と同様の鉄硫黄クラスターを有することが示唆されます。驚くべきことに、AtAcnX ではアコニターゼファミリーでこれまでに見られなかった[2Fe-2S]型鉄硫黄クラスターが配位していました（図 3c）。この結果をさらに検証するために、京都工芸繊維大学のグループと共同で電子スピン共鳴スペクトル（EPR）測定を行いました。その結果、ジチオナイトで完全還元したスペクトルに[2Fe-2S]型鉄硫黄クラスターに特徴的な g 値が観測されました（図 3e）。さらに興味深いのは、mAcn・AtAcnX・TkAcnX のいずれも鉄硫黄クラスターの結合部位は 3 個のシステイン残基ですがアミノ酸配列上で完全に保存されていたのはわずか 1 箇所のみであることです。これは、それぞれの鉄硫黄クラスターが互いに独立に獲得されたことを強く示唆します。

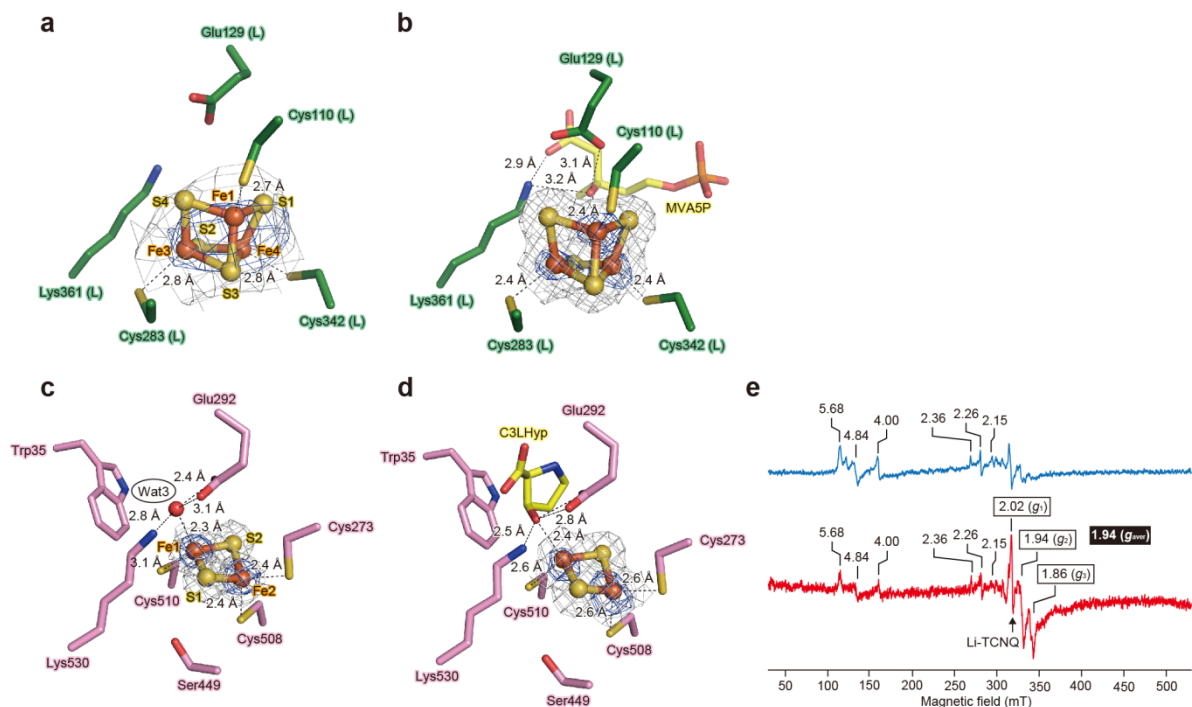


図 3. TkAcnX (a, b) と AtAcnX (c-f) の鉄硫黄クラスターの比較

- (a) TkAcnX のアポ構造
- (b) TkAcnX の MVA5P 複合体構造
- (c) AtAcnX のアポ構造
- (d) AtAcnX の C3LHyp 複合体構造
- (e) AtAcnX の EPR スペクトル (青は酸化状態、赤はジチオナイトによる還元状態)

アコニターゼ X のタイプ I とタイプ II の間で最も大きな謎だったのは、両者がどのようにして構造的にまったく異なる基質を認識しているのか、という点でした(図 1b)。そこで、AtAcnX-C3LHyp 複合体および TkAcnX-MVA5P 複合体の構造を、それぞれ 2.0 Å と 1.9 Å 分解能で決定しました。予想通り、C3LHyp および MVA5P はそれぞれの鉄硫黄クラスターの近傍に結合していました(図 3b, d)。興味深いことに、両基質に共通する α -カルボキシル基と β -水酸基の認識に関与するセリン残基 (Ser293/Ser130(L)) とグルタミン酸残基 (Glu262/Glu192(L))、 α -プロトンの引き抜きを担うセリン残基 (Ser70/Ser62(S)) はよく保存されているのに対し(図 4a)、基質間で特異的な部分の認識に関与する残基は大きく異なっていました(図 4b, c)。

基質構造の点で見ると、MVA5P は C3LHyp に比べてアコニターゼ酵素のものに類似しているにも関わらず、TkAcnX とアコニターゼ酵素の基質認識機構には共通点がほとんどありません。つまり、両者の基質に対する特異性は、鉄硫黄クラスターと同じように独立に獲得されたと考えられます。

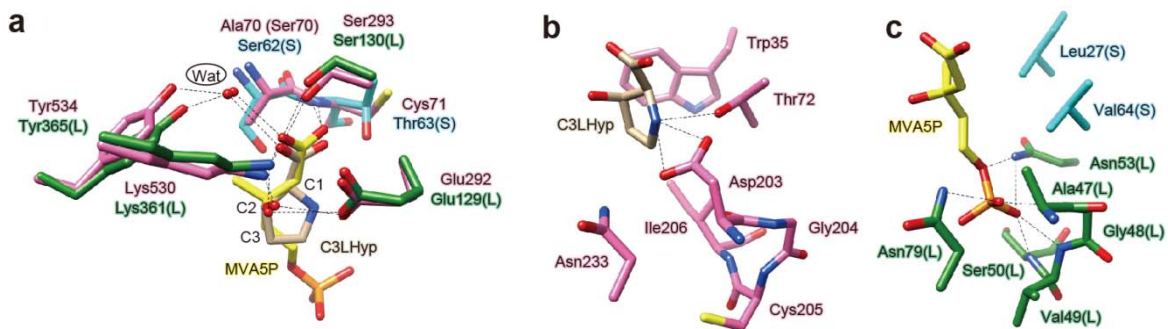


図 4. AtAcnX と TkAcnX の基質結合様式の比較

- (a) C3LHyp (黄土色) と MVA5P (黄) の共通骨格と、AtAcnX (ピンク) と TkAcnX (水色 (S) と緑 (L)) の相互作用
 (b) C3LHyp に特異的な部分と AtAcnX の相互作用
 (c) MVA5P に特異的なリン酸基 (橙) と TkAcnX の相互作用

【研究成果のポイント】

全体構造の類似性から見ると、アコニターゼ X もまたアコニターゼ酵素と共通の祖先から進化した可能性を示唆します。しかしその祖先とは、これまでリクルート仮説に基づいて想定されていたもの (図 5 の共通祖先 1) よりさらに原始的であるに違いありません。すなわち、いかなる鉄硫黄クラスターも持たず、 α -カルボキシル基と β -水酸基を持つ物質に結合する程度の能力しかなかったと考えられます (共通祖先 0)。共通祖先 1 の前に共通祖先 0 がいたであろうことは漠然とは想像できます。しかし、こうした (不完全な) 祖先は進化の過程で淘汰され現在は失われていることから、“いまあるもの”からその姿を類推できた本研究は、タンパク質の分子進化に新たな知見を与えると期待されます。

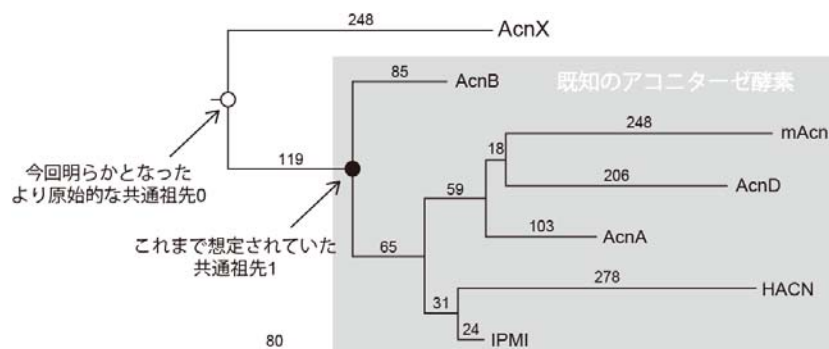


図 5. アコニターゼファミリーの分子系統樹

【論文情報】

掲載誌：Communications Biology **4**, 687 (2021)

題 名：Crystal structures of aconitase X enzymes from bacteria and archaea provide insights into the molecular evolution of the aconitase superfamily.

（細菌と古細菌由来のアコニターゼ X の結晶構造はアコニターゼスーパーファミリーの分子進化に関する知見を提供する）

著 者：渡辺誠也^{1,2,3#*}，村瀬陽介^{1#}，渡邊康紀^{1,2,4}，櫻井康博⁵，田嶋邦彦⁵

¹ 愛媛大学大学院農学研究科

² 愛媛大学農学部

³ 愛媛大学沿岸環境科学研究センター

⁴ 山形大学学術研究院

⁵ 京都工芸繊維大学

* 責任著者

共筆頭著者

DOI：10.1038/s42003-021-02147-5

（参考文献）

1. Watanabe, S., Tajima, K., Fujii, S., Fukumori, F., Hara, R., Fukuda, R., Miyazaki, M., Kino, K., Watanabe, Y. (2016) Functional characterization of aconitase X as a *cis*-3-hydroxy-L-proline dehydratase. *Sci. Rep.* **6**, 38720.
2. Hayakawa, H., Motoyama, K., Sobue, F., Ito, T., Kawaide, H., Yoshimura, T., Hemmi, H. (2018) Modified mevalonate pathway of the archaeon *Aeropyrum pernix* proceeds via *trans*-anhydromevalonate 5-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **115**, 10034-10039.

本件に関する問合せ先

愛媛大学大学院農学研究科

（沿岸環境科学研究センター教授 兼任）

教授 渡辺 誠也

TEL: 089-946-9848

Mail: irab@agr.ehime-u.ac.jp

山形大学 学術研究院（理学部主担当）

講師 渡邊 康紀

TEL:023-628-4529

Mail: yasunori@sci.kj.yamagata-u.ac.jp

京都工芸繊維大学総務企画課広報係

TEL: 075-724-7016

Mail: koho@jim.kit.ac.jp