

博士論文 (要約)

Doctoral Dissertation

ラン藻由来アルカン合成関連酵素の物性解析
(Analysis of physical properties of cyanobacterial
enzymes for alkane biosynthesis)

令和元年12月博士(理学)申請

A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor of

Philosophy

December 2019

東京大学大学院理学系研究科

物理学専攻

Department of Physics, Graduate School of Science,

The University of Tokyo

張 マリ

Mari Chang

Abstract

ラン藻によるアルカンの合成は、アシル - (アシル輸送タンパク質) 還元酵素 (acyl-(acyl carrier protein (ACP)) reductase, AAR) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (aldehyde deformylating oxygenase, ADO) という2つの酵素を用いた2段階の反応で触媒される。AAR はアシル ACP をアルデヒドに還元し、ADO がこれをアルカンに変換する。しかし、これらの酵素活性は低く、AAR と ADO をバイオエネルギー生産に応用するためには、両者の高活性化が必要である。最近、AAR と ADO が相互作用してアルデヒドを効率的に受け渡すことが示唆されたが、この相互作用のメカニズムは未解明である。また、ADO が機能を発揮する上で重要なアミノ酸残基、ADO を高活性化させる変異体は未だ明らかでない。そこで本研究では、AAR と ADO に関わる2つの研究を行った。最初に、2つの酵素の相互作用を明らかにすることを目的とした。まず、ゲルろ過 (SEC) 実験を行い、両酵素の結合に静電相互作用が重要なことを示した。次に、ADO の基質進入部位周辺の荷電残基のアラニンスキャン変異解析を行い、E201A 変異体では炭化水素の生産を大幅に減少することがわかった。さらに、この変異体の SEC 測定により、ADO の E201が AAR-ADO 相互作用に必須であることを証明した。また、この結果は、AAR が ADO の基質進入部位付近に結合することを示唆している。

二つ目のテーマとして、ADOの機能発現に重要な部位を探索するためにアラニンスキャン変異解析を完成させ、その知見を用いて高活性化ADO変異体を創出することを目指した。その結果については、5年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開する。

Abstract

Cyanobacterial biosynthesis of alkanes is catalyzed by a two-step reaction involving two enzymes, acyl-(acyl carrier protein (ACP)) reductase (AAR) and aldehyde-deformylating oxygenase (ADO). AAR reduces acyl-ACPs to aldehydes, which are then converted into alkanes by ADO. However, catalytic efficiencies of these enzymes are low and are required to be improved for their application to bioenergy production. Recently, both enzymes are reported to interact with each other for efficient delivery of aldehyde from AAR to ADO. However, the mechanism of this interaction remained unclear. Therefore, one of the purposes of this study was to clarify the interaction between the two enzymes. Using analytical size-exclusion chromatography (SEC), electrostatic interactions were shown to play an important role in the binding of both enzymes. By an alanine-scanning mutagenesis of charged residues around the substrate entry site of ADO, the E201A mutant was found to significantly reduce hydrocarbon production. SEC measurement of the mutant showed that E201 of ADO is essential for the interaction between AAR and ADO. These results suggest that AAR binds to the ADO substrate entrance gate.

Secondly, an alanine-scanning mutagenesis for ADO was completed to search for the residues essential for exerting ADO function. Then, using these information, production of highly active ADO mutants were attempted. The results will not be published because they will be published in journals, etc. within five years.

目次

第1章 序論	7
1.1 バイオエネルギー	7
1.2 ラン藻によるアルカン合成	7
1.3 アシルACP還元酵素 (AAR)	8
1.4 アルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO)	9
1.5 本研究の目的	10
1.6 図	12
第2章 アルカンの合成に必要な2つの酵素の相互作用	14
2.1 序論	14
2.2 方法	15
2.2.1 培地の作製	15
2.2.2 AARとADOの発現と精製	15
2.2.3 分析用ゲルろ過クロマトグラフィー	18
2.2.4 円偏光二色性 (CD) スペクトルと熱変性測定	19
2.2.5 ADOの <i>in vivo</i> での活性測定	19
2.2.6 ADOの <i>in vitro</i> での活性測定	20
2.3 結果	21
2.3.1 2つの酵素の結合について	21
2.3.2 相互作用部位の探索	22

2.4 考察と結論.....	26
2.5 図.....	28
第3章 アルカン合成酵素ADOの変異解析.....	39
第4章 結論.....	40
第5章 参考文献.....	41
第6章 謝辞.....	44

略語一覧

- AAR : acyl-(acyl carrier protein) reductase, アシル ACP 還元酵素
ACP : acyl carrier protein, アシル輸送タンパク質
ADO : aldehyde deformylating oxygenase,
アルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ
CD : circular dichroism, 円偏光二色性
DTT : dithiothreitol, ジチオスレイトール
GC-MS : gas chromatography-mass spectrometry
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MRE : mean residue ellipticity, 平均残基楕円率
Ni-IDA : nickel-iminodiacetic acid
Ni-NTA : nickel-nitrilotriacetic acid
OD : optical density, 光学密度
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
SEC : size-exclusion chromatography, サイズ排除(ゲルろ過)クロマトグラフィー
RALS : Right-angle light scattering
WT : wild type, 野生型
- 73102AAR : *Nostoc punctiforme* PCC 73102 由来 AAR
73102ADO : *Nostoc punctiforme* PCC 73102 由来 ADO
7942AAR : *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR
7942ADO : *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 ADO
9313ADO : *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 由来 ADO
TeAAR : *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来 AAR
TeADO : *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来 ADO

第1章 序論

1.1 バイオエネルギー

現在使用されている化石燃料は、古代生物が埋もれて長い時間をかけて作られたものであり、燃焼してしまうと再生できないため、有限の資源である。それゆえ、他のエネルギーに置き換えることができないと、いつか資源は枯渇し、エネルギー使用において大きな問題が生じる。また、化石燃料をエネルギーとして使用したときに二酸化炭素が発生して地球温暖化が起き、環境問題となっている。したがって化石エネルギーの代わりに、枯渇することなく、かつ、使用したときに二酸化炭素を増加させない再生可能エネルギーの開発が急務となっている。

再生可能エネルギーの中に、バイオマスを燃料にして得られるバイオエネルギーがある。バイオエネルギーは、生物を利用して作られた新エネルギーである。エネルギー源として利用されるバイオマスは、太陽の光を化学エネルギーの形で固定化した有機物であり、木、わら、肥料などその他の様々な農業の過程で出てきた副産物を燃料として使用できる。植物由来のバイオ燃料では、燃焼して生産される二酸化炭素を植物が吸収し、光合成によって再びバイオマスを生産するため、大気中の二酸化炭素の量を増加させない。これをカーボンニュートラルな再生可能エネルギーという。したがって、化石エネルギーに比べ、バイオマス由来のバイオエネルギーは環境に非常に優しい。

しかし、大豆やトウモロコシなどの食物を使ったバイオエネルギーは、食物と競合するために価格が上昇するおそれや、バイオマスを得るために広い土地が必要という問題がある。また、樹木や有機性廃棄物を用いたバイオエネルギーは、処理するための費用が高いという欠点がある。

これに対し、藻類は、軽油や重油の主成分であるアルカンを光合成によって生産できるため、非枯渇性資源であるバイオ燃料の生産源として注目されている[Brennan & Owende, 2010]。藻類の一種であるラン藻は微生物であり、ラン藻によるバイオエネルギー生産は他の方法に比べて安く、生育に必要な時間が短いため、効率的である。また、食物価格の変化に影響がなく、休耕田や海洋などを使って培養できる。したがって、藻類によるバイオエネルギーは現在、化石燃料に代わる新たな再生可能エネルギーとして期待されている。

1.2 ラン藻によるアルカン合成

藻類の一種であるラン藻 (シアノバクテリア) は、細胞内に核のない原核生物

であり、光合成によって酸素を作り出す生物である。また、ラン藻は軽油や重油の主成分であるアルカン (炭素数 13 – 17) を合成することができる [Winters *et al.*, 1969; Schirmer *et al.*, 2010; Coates *et al.*, 2014]。しかし、ラン藻によるアルカンの生産効率は低いため、ラン藻によるバイオ燃料生産を実用化するためには、その生産効率を高めることが不可欠である。

生物による物質生産効率を向上させる方法の一つは、物質生産に関与する酵素の活性を高めることである。したがって、ラン藻が持っているアルカン合成関連酵素を発見し、その酵素の活性を増大させる変異体を作製すれば、ラン藻によるバイオエネルギーの生産を実用化できると期待される。

近年、ラン藻によるアルカンの合成に直接関与する 2 つの酵素が同定された。アシル – (アシル輸送タンパク質) 還元酵素 (acyl-(acyl carrier protein (ACP)) reductase, 以下 AAR と略す) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (aldehyde deformylating oxygenase, 以下 ADO と略す) である [Schirmer *et al.*, 2010; Arai *et al.*, 2018]。この 2 つの酵素は、図 1 のような 2 段階の反応の各段階を触媒する。最初のステップでは AAR が NADPH を使用して、脂肪酸合成の中間産物である脂肪酸アシル ACP を長鎖アルデヒドに還元する。2 番目のステップでは ADO がアルデヒドのカルボニル基を切除し、C13 – C17 の長鎖アルカン (またはアルケン) とギ酸を生成する [Warui *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012]。また、この酵素を大腸菌で発現させると、大腸菌はアルカンを合成して分泌することができる [Schirmer *et al.*, 2010]。したがって、これら 2 つの酵素 AAR と ADO は、生物を使用したアルカン合成の鍵であり、これらの酵素の活性を改善することにより、ラン藻や大腸菌などを用いたバイオ燃料の効率的な生産が可能になる。

1.3 アシルACP還元酵素 (AAR)

アルカン合成の最初の段階で触媒作用をする酵素 AAR は、約 340 残基からなる球状タンパク質である。AAR の反応は“ping-pong”メカニズムによると考えられている [Lin *et al.*, 2013]。このメカニズムでは、基質である脂肪酸アシル ACP と AAR が結合した後、AAR はアシル ACP を ACP と脂肪酸アシル基に分解する。ACP は AAR から分離され、AAR の Cys294 と脂肪酸アシル基がチオエステル結合を形成する。その後、NADPH を用いて脂肪酸アシル基が還元され、AAR から長鎖アルデヒドが生成されたと考えられている [Lin *et al.*, 2013; Warui *et al.*, 2015]。

AAR の活性は低く、分子活性 $k_{\text{cat}} \sim 0.17 \text{ min}^{-1}$ である [Warui *et al.*, 2015]。また、この酵素はアシル ACP のほかに、基質としてアシル CoA を用いることができるが、その活性も $k_{\text{cat}} \sim 0.36 \text{ min}^{-1}$ で低い [Lin *et al.*, 2013]。所属研究室のこれま

での研究から、様々なラン藻に由来する AAR の中で活性が最も高いものは、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR (以下では、7942AAR と略す) であることが明らかになっている [Kudo *et al.*, 2016]。また、所属研究室による最近の研究により、AAR に変異を導入して高機能化させ、大腸菌による炭化水素の生産性を向上させることに成功している [Kudo *et al.*, 2019b]。

AAR は凝集しやすいタンパク質であり、高濃度に濃縮することが困難である [Warui *et al.*, 2015; Kudo *et al.*, 2019b]。X 線結晶構造は知られていないが、先行研究によると、N 末端ドメイン、中間ドメイン、C 末端ドメインという 3 つのドメインで構成されていることが示唆されている [Kudo *et al.*, 2019b]。また、所属研究室の先行研究により、X 線溶液散乱法によって AAR の構造概形のモデリングが行われており、3 つの球状ドメインがクローバーのように配置された構造を持つと考えられている [工藤, 2016]。

1.4 アルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO)

アルカン合成の 2 番目の段階で触媒として働く酵素 ADO は、約 230 残基からなる球状タンパク質である。ADO は N 末端側から Helix1 ~ Helix8 (H1 ~ H8) という 8 つの α ヘリックスで構成されている。このような ADO の構造は、複数種類のラン藻に由来する ADO の X 線結晶解析で報告されている [Buer *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016]。その中で代表的な構造は、海洋性ラン藻である *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 由来 ADO (以下、9313ADO と略す) の結晶構造である [Buer *et al.*, 2014] (図 2)。

AAR が合成するアルデヒドは ADO にとっての基質であり、AAR が ADO と結合することによって、アルデヒドが AAR から ADO に受け渡されると考えられている [Warui *et al.*, 2015]。しかし、その詳細は未解明である。

AAR から ADO に受け渡されたアルデヒドは、ADO 内部に埋もれた長い疎水性トンネルに入り込む。このトンネルの入口 (基質進入部位) は、触媒中心から離れたヘリックス H6 ~ H8 に囲まれた領域と推定されている [Buer *et al.*, 2014]。基質であるアルデヒドは、2 つの鉄原子が結合している触媒中心で炭化水素に変換される [Buer *et al.*, 2014]。このように、長い疎水性トンネル内の奥深くにアルデヒドが入り、触媒反応を行ったあと、生成された (疎水的な) 炭化水素が長い疎水性トンネルから解離するという一連の反応は非効率的と考えられる [Arai *et al.*, 2018]。実際に ADO の活性は非常に低い。複数のラン藻由来の ADO の触媒活性を比較した先行研究では、*Nostoc punctiforme* PCC 73102 由来 ADO (以下、73102ADO と略す) が最も高い活性を持っていることが報告されている [Schirmer *et al.*, 2010]。しかし、ADO の $k_{\text{cat}} = 0.1 \sim 1 \text{ min}^{-1}$ 程度であり、AAR と同

様に低活性である [Eser *et al.*, 2011; Andre *et al.*, 2013]。

基質であるアルデヒドは、ADO の内部に完全に埋もれているので、立体構造を見ただけでは、アルデヒドがどこから ADO 内部に進入し、生成物である炭化水素がどこから放出されるのかは明らかでない。しかし、Buer *et al.* (2014) は、1つの ADO に 2 分子の基質アナログが結合した結晶構造を得た (PDB ID: 4PG1)。この構造では、一つの基質アナログ分子は ADO の内部に結合しており、残りの一つは、C 末端側のヘリックス H6 ~ H8 に囲まれた部位に結合していた。このことは、ヘリックス H6 ~ H8 で囲まれた領域が基質の進入部位であることを示唆している。また、Buer *et al.* (2014) による別の結晶構造 (PDB ID: 4PGI) では、3つのヘリックス H6 ~ H8 で囲まれた部分に疎水性の空洞 (キャビティー) が存在することが報告されている (図 2 (A))。このキャビティーの中心に、電子密度が低く、かつ、高い機動性を持っている Leu 残基が存在し (73102ADO の 182 残基目)、これが疎水性の基質を捕獲すると考えられる。したがって、H6 ~ H8 の 3つのヘリックスで囲まれた領域が基質の進入部位であることが示唆されている [Buer *et al.*, 2014]。

所属研究室の先行研究により、73102ADO の (N 末端以外の) 全残基を 1 つずつアラニンに置換するアラニンスキャン変異解析が行われている (元々アラニンの部位はグリシンに置換した) [榛葉, 2017]。これにより、ADO が機能を発現する上で重要なアミノ酸残基や、変異を導入することによって高活性化しうる部位を同定できると期待される。しかし、このアラニンスキャン変異解析は未完成で、まだ全ての残基についての変異体の解析が完了していなかったため、この研究を完了させることが急務となっている。

1.5 本研究の目的

以上のように、酵素 AAR と ADO は、効率的なバイオ燃料生産に有用と期待されており、様々な研究が行われてきているが、AAR と ADO との相互作用、ADO が機能を発現する上で重要なアミノ酸残基、および、ADO を高活性化させる変異体については、未だ明らかでない。これらを明らかにすることは、AAR と ADO を用いたアルカン合成を効率化する上で重要である。

まず、2 つの酵素の相互作用については、アルカン合成を効率的にするために非常に重要な要素であるが [Warui *et al.*, 2015]、詳細は未解明である。そこで、本研究の第 2 章では、酵素 AAR と ADO の結合に重要な相互作用について明らかにし、AAR が ADO のどの部位に結合するかを調べた。

次に第 3 章では、ADO が機能を発現する上で重要なアミノ酸残基の同定と、ADO を高活性化させる変異体の構築を目指して研究を行った。未完成だった ADO のアラニンスキャン変異解析を完了させた後、その知見を用いて高活性化

ADO を設計し、実際に作製してみるにより、野生型 ADO よりも高活性化した ADO を創出した。

1.6 図

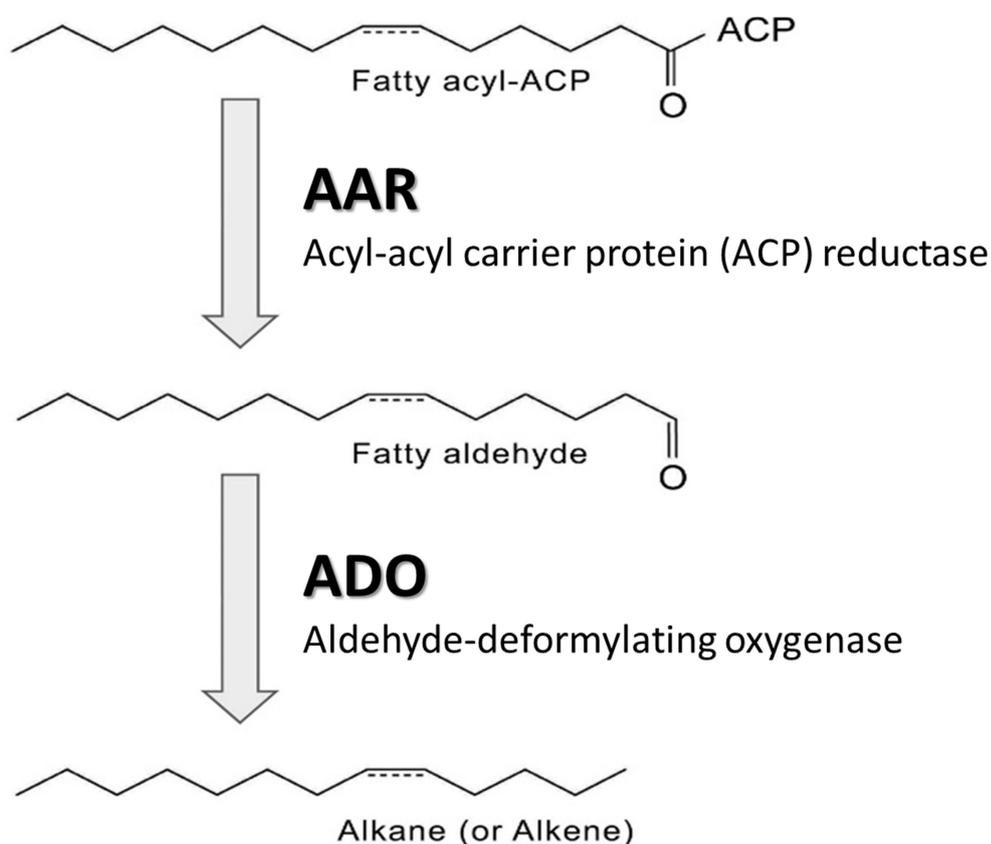


図1. ラン藻 (シアノバクテリア) でのアルカン合成反応

ラン藻でのアルカン合成反応には、アシルACP還元酵素 (acyl-(acyl carrier protein (ACP)) reductase, AAR) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (aldehyde deformylating oxygenase, ADO) という2つの酵素が関与している。これらの酵素は、2段階反応の各ステップで触媒として機能する。まず、AARは脂肪酸アシルACPを還元してアルデヒドを作る。次に、ADOはアルデヒドからカルボニル基を切除し、C13からC17までの長鎖アルカン (あるいはアルケン) を合成する[Schirmer *et al.*, 2010]。AARが合成した長鎖アルデヒドは、AARとADOが結合することによってADOに効率的に受け渡されると考えられている。

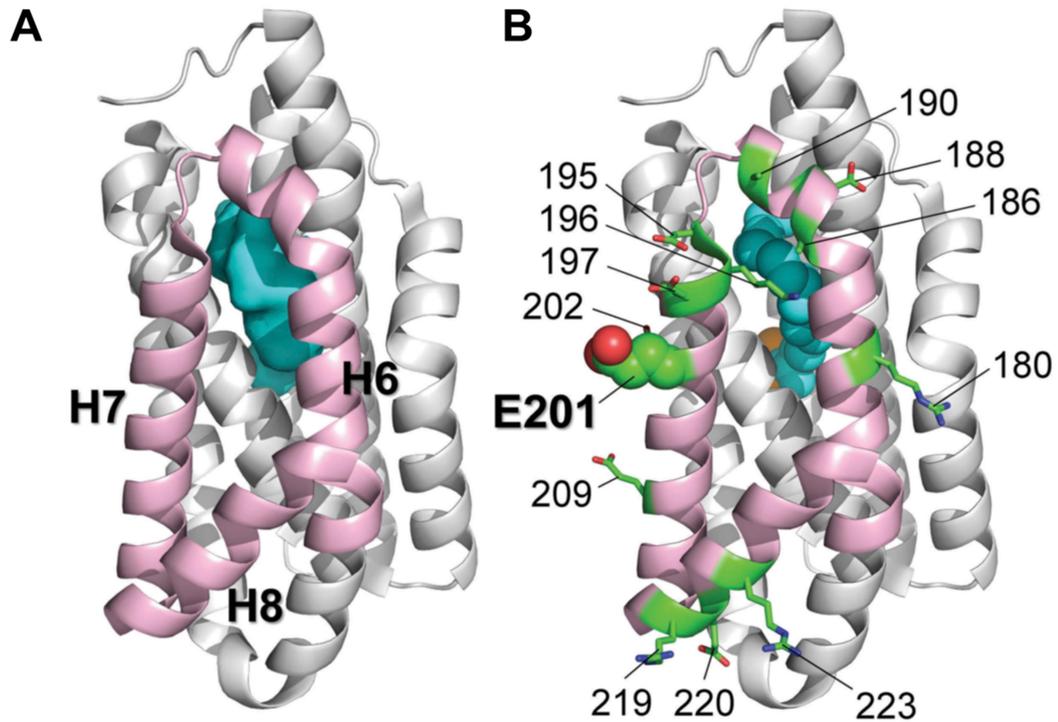


図2. 9313ADOの結晶構造

基質進入部位であるヘリックスH6 ~ H8はピンク色で表示してある (PDB ID: 4TW3)。

(A) ADOの疎水性トンネルをシアン色で表示したものの。

(B) 基質アナログであるステアリン酸をシアン色で、配位している鉄原子をオレンジ色で表示してある。第2章におけるアラニンスキャン変異解析によってアラニン置換が導入されたヘリックスH6 ~ H8上の荷電性残基は、E201を除いて、棒モデルで表示してある。E201は空間充填モデルで示してある。緑、赤、青はそれぞれ炭素、酸素、窒素原子を表す。

第2章 アルカンの合成に必要な2つの酵素の相互作用

2.1 序論

第1章で述べたように、ラン藻では2つの酵素を用いた2段階反応によってアルカンが合成される。その過程で合成される長鎖アルデヒドは、水に対しての溶解性が低く、ミセルを形成しやすい [Li *et al.*, 2012]。AARによって合成されたアルデヒドがミセルを形成すると、ADOへの基質の供給は非効率的になり、ミセルからのアルデヒドの解離が、アルカン合成の律速段階になりうる [Li *et al.*, 2012]。さらに、アルデヒドは反応性が高いため、AARからADOに直接受け渡されない場合には、アルコールなどの物質に変換されてしまう可能性がある。したがって、アルカン合成反応を促進するためには、AARからADOへのアルデヒドの効率的な受け渡しが必要である。実際、AAR-ADOを融合させたキメラタンパク質の構築により、炭化水素合成量が増加したという報告がある [Rahman *et al.*, 2014]。

興味深いことに、73102ADOが同じラン藻種 (*Nostoc punctiforme* PCC 73102) 由来のAAR (73102AAR) と相互作用することが最近報告された [Warui *et al.*, 2015]。両酵素の結合における解離定数 $K_d = 3.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ であった [Warui *et al.*, 2015]。さらに、73102ADOの炭化水素合成量は、73102AARが存在しない場合と存在する場合とで比較すると、73102AARの存在によって2倍に増加した [Warui *et al.*, 2015]。この結果は、AARがADOに結合し、基質であるアルデヒドをADOに効率的に受け渡すことを示唆している。しかし、AARとADO間の相互作用の詳細なメカニズムは未解明であった。

本研究では、この問題に解決するために、AARとADOの相互作用について調べた。まず、2つの酵素をそれぞれ単独で精製できる系を構築し、両者を混合したときに実際に結合できることを確認した後、結合の塩濃度依存性を調べた。次に、X線結晶構造が知られているADO上のAAR結合部位を探索した。結合部位を明らかにすることにより、ADO内の基質進入部位についても明らかになった。

2.2 方法

2.2.1 培地の作製

2×YT寒天培地

MilliQ 1 LにBacto-tryptone 16 g, Bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g, Bacto-agar 7.5 gを溶かして121 °Cで30 分間オートクレーブ滅菌した後、抗生物質としてカルベニシリン 50 µg/mLとクロラムフェニコール 34 µg/mLを最終濃度になるように加えて50 枚のプレートを作製した。

2×YT液体培地

MilliQ 500 mLにBacto-tryptone 8 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 5 gを溶かして121 °Cで30分間オートクレーブ滅菌した後、抗生物質アンピシリン 50 µg/mLとクロラムフェニコール 34 µg/mLを最終濃度になるように加えて4 °Cで保存した。

M9培地

まず、MilliQ 1 LにNa₂HPO₄ 68 g, KH₂PO₄ 30 g, NaCl 5 gを溶かして121 °Cで30分間オートクレーブ滅菌して10×M9を作製した。10×M9 50 mLをMilliQ 450 mLで希釈した後、オートクレーブ滅菌し、1×M9を作った。また、D(+)-グルコース 1.5 g, NH₄Cl 0.25 g, (NH₄)₂SO₄ 0.25 gをMilliQ 10 mLに溶かす。これに0.1 M CaCl₂水溶液 0.5 mLを追加したものを0.22 µmのメンブレンフィルターでろ過滅菌した後、全量を1×M9に加えた。そこに滅菌した1 M MgCl₂水溶液を0.5 mLと抗生物質アンピシリン 50 mg/mL、クロラムフェニコール34 mg/mLを500 µLずつ加えた (最終濃度：アンピシリン 50 µg/mL、クロラムフェニコール34 µg/mL)。銀紙でフラスコを覆って遮光し、4 °Cで保存した。

2.2.2 AARとADOの発現と精製

AARまたはADOの単一発現用プラスミドを構築するために、ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1由来のAARまたはADO (*TeAAR*, *TeADO*) をコードした遺伝子のDNAフラグメントをpETDuet-1ベクター (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に挿入した。ラン藻 *Synechococcus elongatus*

PCC 7942由来AAR (7942AAR) と73102ADOの共発現のためのプラスミドは、以前に構築されたものを用いた [Hayashi *et al.*, 2015]。ADOのすべての変異体は、QuikChange Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA) のプロトコールに従って作製した。この研究で使用されたすべてのAARおよびADOタンパク質には、C末端側にGly-Ser-Ser-Glyと6×His-tagが付けてある。プラスミド中のAARおよびADOの塩基配列は、FASMAC社 (神奈川、日本) にDNAシーケンス解析を外注して確認した。また、すべての共発現ベクターに、AARとADOの両方の遺伝子が存在することをDNAシーケンス解析によって確認した。

*TeAAR*を発現させるために、大腸菌BL21(DE3)pLysSコンピテントセル (バイオダイナミクス研究所、東京、日本) を*TeAAR*発現プラスミドで形質転換し、50 µg/mLカルベニシリンと34 µg/mLクロラムフェニコールを含む2×YT寒天培地に植菌し、37 °Cで16時間培養した。大腸菌コロニーを寒天培地から採取し、50 µg/mLのアンプシリンと34 µg/mLのクロラムフェニコールが含まれている2×YT液体培地20 mLに加え、220 rpm, 37 °Cで一晩振とう培養した (前培養液)。前培養液を1 LのM9最少液体培地に入れ、培養液を37 °Cで培養した。培養液の濁度 (OD₆₀₀) が0.6になったときにインキュベーターの温度を15 °Cに下げ、培養液のOD₆₀₀が0.7に達したときに1 mM IPTGを添加してタンパク質発現を誘導した。その後15 °Cでさらに22時間インキュベートしたのち、冷却遠心機 (KUBOTA6500) でAG-5006Aローターを用いて、12,310×g, 4 °Cで集菌した。

*TeAAR*タンパク質を精製するために、集めた大腸菌 (培養液2 L分) を40 mLのBuffer AR (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 3 mM dithiothreitol (DTT)) で懸濁し、超音波破砕機SONIFIER Model 250 (BRANSON) を用いて菌体を破砕した (total ON time = 4 min、Amp 35 %、ON 0.5 sec、OFF 1 sec)。破砕した液を35,140×g、4°Cで30分間遠心分離し、上清を5 µmと0.45 µm のフィルターを連結させてメンブレンろ過を行った。これを、Buffer ARで平衡化されたニッケルニトリロ三酢酸樹脂 (nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin; Qiagen, Hilden, Germany) を含むガラス製Econo-Column® gravityカラム (50 mL; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にアプライした。カラムを室温で20分間、30 rpmで振盪後、40 mLのBuffer ARで10回洗浄して核酸などの不純物を除いた。その後、40 mLのBuffer BR (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 3 mM DTT) でAARをカラムから溶出した。精製したAARを、Amicon Ultra-15 30K (Milipore) を使って濃縮し、0.45 µmメンブレンフィルターでろ過し、ゲルろ過用バッファー (10 mM HEPES (pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10% glycerol) で平衡化された、サイズ排除クロマトグラフィー (size-exclusion chromatography, SEC) 用のSuperdex 200pgカラム (GE Healthcare, Chicago,

USA) にアプライし、ÄKTA prime plusクロマトグラフィーシステム (GE Healthcare) を使ってAARを高純度精製した。精製されたタンパク質の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって調べた。

*TeADO*の野生型およびE201A変異体の発現と精製は、先行研究で記載されている方法を用いて実施した [Hayashi *et al.*, 2015]。具体的には、野生型とE201A変異体それぞれの*TeADO*発現プラスミドで大腸菌BL21(DE3)pLysSコンピテントセルを形質転換した。その後、50 µg/mLカルベニシリン、34 µg/mLクロラムフェニコールが含まれている2×YT寒天培地に植菌し、37 °Cで16時間培養した。50 µg/mLアンピシリン、34 µg/mLクロラムフェニコールが含まれている2×YT液体培地10 mLに寒天培地から大腸菌コロニー複数個を植菌し、220 rpm, 37 °Cで一晩振とう培養した (前培養液)。この前培養液10 mLを50 µg/mLアンピシリン、34 µg/mLクロラムフェニコールと0.1 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂が含まれている2×YT液体培地1 Lに入れ、100 rpm, 37 °Cで振とう培養した。培養液の濁度OD₆₀₀ = 0.7 – 0.8になった際に1 mMのIPTGを添加し、タンパク質の発現を誘導した。3時間振とう培養後、12,310×g, 4 °Cで1 L分ずつ菌体を集めた。

集めた大腸菌 (培養液1 L分) を40 mLのBuffer AP (50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 3 mM DTT) で懸濁後、超音波破碎した。Buffer APで平衡化されたニッケルアガロースゲル (nickel-iminodiacetic acid, Ni-IDA) (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本) を含むEcono-Column® gravityカラムに破碎液をアプライし、Buffer APでカラムを洗浄後、溶出には、Buffer BP (50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4), 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, 3 mM DTT) を用いた。溶出したADOを濃縮し、0.45 µmメンブレンフィルターでろ過後、ゲルろ過用バッファー (10 mM HEPES (pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT) で平衡化されたSEC用のSuperdex 200pgカラムにアプライし、AARと同じプロトコールを使用してADOを高純度精製した。その純度はSDS-PAGEで確認した。

AARおよびADOの濃度は、Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して測定した。バッファーにDTTが含まれているため、Reducing Agent Compatibleのキットを用いた。分析SEC実験の際には280 nmでの紫外吸収 (UV) でタンパク質の溶出をモニターしたが、AARの吸光係数 (41,940 M⁻¹ cm⁻¹) はADOの吸光係数 (24,410 M⁻¹ cm⁻¹) よりも大きいと、両方のタンパク質の濃度が同じ場合には、AARのピーク強度はADOのピーク強度よりも大きい様子が観察された。

2.2.3 分析用ゲルろ過クロマトグラフィー

high-performance liquid chromatography (HPLC) システム (LP-20AP、島津、京都、日本) およびSEC用の Superdex 75 increase 3.2/300 カラム (GE Healthcare) を使用して、分析SEC測定を行った。ウシ血清アルブミン (BSA, 66 kDa)、オボアルブミン (44 kDa)、炭酸脱水酵素 (29 kDa)、リゾチーム (14 kDa) を標準試料として使用した。カラムを10 mM HEPES (pH 7.5), 50 ~ 250 mM NaCl, 10 % glycerol, 5 mM DTTで事前に平衡化し、*Te*AARまたは*Te*ADOのサンプルをSECカラムにアプライした。AAR-ADO相互作用の塩濃度依存性の分析の際には、NaCl濃度を50, 150, 250 mMに変化させた。

具体的には、以下のサンプルをSECカラムにアプライした。

- NaCl濃度が150 mMのとき
 - ① 50 μ M ADO-WT
 - ② 50 μ M AAR
 - ③ 50 μ M ADO-WT + 50 μ M AAR
 - ④ 67 μ M ADO-WT + 33 μ M AAR
 - ⑤ 33 μ M ADO-WT + 67 μ M AAR
 - ⑥ 50 μ M ADO-E201A
 - ⑦ 50 μ M ADO-E201A + 50 μ M AAR
 - ⑧ 36 μ M ADO-WT
 - ⑨ 36 μ M AAR
 - ⑩ 36 μ M ADO-WT + 36 μ M AAR
- NaCl濃度が50 mM または250 mMのとき
 - ① 36 μ M ADO-WT
 - ② 36 μ M AAR
 - ③ 36 μ M ADO-WT + 36 μ M AAR

Viscotek TDA 305光散乱検出器 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) に接続したHPLCシステムでタンパク質試料の分子量を測定した。機器のキャリブレーションの標準試料としてBSAを使用した。データ解析には、OmniSECソフ

トウェア (Malvern Panalytical) を用いた。分子量の誤差は、2回または3回の測定から計算した。

2.2.4 円偏光二色性 (CD) スペクトルと熱変性測定

ADOの野生型と変異体のCDスペクトルと熱変性測定は、先行研究に記載されているように、J-805円二色性分散計 (JASCO、東京、日本) を使用して行った [Hayashi *et al.*, 2015]。CDスペクトル測定には、光路長1 mmの石英キュベットを使用し、波長200 ~ 250 nmの範囲を測定した。タンパク質濃度 0.2 mg/mL、バッファー組成は10 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTTであり、スキャン速度50 nm/min, レスポンス 1 sec, 積算回数10回, 温度 25 °Cの設定で測定した。観測されたCD値は、以下の式を用いて平均残基楕円率 (mean residue ellipticity, MRE) に変換した [Arai *et al.*, 2005]。

$$\text{MRE (deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) = \frac{\text{CD (mdeg)}}{L \text{ (mm)} \times c \text{ (M)} \times N} \quad \text{式 (1)}$$

L はキュベットの光路長 (1 mm)、 c はタンパク質濃度 (M)、 N はタンパク質のアミノ酸残基数を示す。

ADOの野生型および変異体の熱変性は、222 nmでのCD値の温度変化をモニターすることによって測定した。キュベットの温度は、冷却水循環型の恒温槽を使用して、1.2 °C/分の速度で5 °Cから90 °Cまで上昇させた。その温度は熱電対で測定した。タンパク質濃度は0.2 mg/mL、バッファー組成は10 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTTであり、キュベットの光路長1 mm、データ取り込み間隔 5 sec/data、レスポンス 1 secであった。各サンプルの測定は2回ずつ実施した。測定されたCD値 (mdeg) を、式 (1)を用いて平均残基楕円率に変換した。

2.2.5 ADOの*in vivo*での活性測定

ADOの*in vivo*炭化水素合成における活性は、先行研究と同様に測定した [Hayashi *et al.*, 2015; Kudo *et al.*, 2019a]。大腸菌BL21(DE3)pLysSコンピテント

セルを、7942AARと野生型または変異型の73102ADOの共発現用プラスミドで形質転換した。これを0.1 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 1 mM IPTGを含むM9最少液体培地に植菌し、ディープウェルプレート用インキュベーターを使用して37 °Cで16時間培養した。その後、Bioruptor Ultrasonicator UCD-250 (Cosmo Bio、東京、日本) を使用して培養液を超音波破碎した (最大出力、30 sec ON/30 sec OFFのサイクルを10分間)。酢酸エチルを用いて破碎液から炭化水素を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)) GCMS QP2010 Ultra (島津、京都、日本) を使って定量した。破碎液を23,470 ×gで30分間遠心し、可溶性画分にあるADOと沈殿して不溶性画分にあるADOを分離した。両者を12 % SDS-PAGE用ゲルにアプライし、可溶性および不溶性のADOタンパク質を定量した。定量には、Gel Doc EZイメージャー (Bio-Rad) を使用してゲル画像を撮影後、ImageLab 5.1ソフトウェア (Bio-Rad) を用いてADOバンドの強度を測定した。コントロール実験により、こうして得られたADOバンドの強度は、タンパク質の濃度に対して線形性を持っていることを確認した。可溶性ADO量、炭化水素合成量、ADOの活性は、以下の式(2) ~ (4)のようにして計算した。式(2)においてはSDS-PAGEの結果、式(3)においてはGC-MSの結果を用いた。また、ADOの活性は、可溶性ADO量で規格化した炭化水素合成量として計算した (式(4))。

$$\text{可溶性ADO量} = \frac{\text{変異体の可溶性ADOのバンド強度}}{\text{野生型の可溶性ADOのバンド強度}} \quad \text{式 (2)}$$

$$\text{炭化水素合成量} = \frac{\text{変異体の炭化水素のピークの高さの合計}}{\text{野生型の炭化水素のピークの高さの合計}} \quad \text{式 (3)}$$

$$\text{活性} = \frac{\text{炭化水素合成量}}{\text{可溶性ADO量}} \quad \text{式 (4)}$$

2.2.6 ADOの*in vitro*での活性測定

ADOによる*in vitro*炭化水素合成は、100 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM KCl, 10% glycerol, 4% dimethyl sulfoxide (DMSO)を含むバッファーに20 μM *Te*ADO (野生型またはE201A変異体), 20 μM ferrous ammonium sulfate, 75 μM 5-methylphenazinium methylsulfate, 1 mM NADH, 50 μM octadecanalの反応混合物を使用して行った [Eser *et al.*, 2011]。基質として用いたoctadecanalは、DMSOで溶かした後に調製した。反応混合物 (1 mL) を30 rpmで16時間、37 °Cで振盪した。等量の酢酸エチルを反応混合物に加えて反応を停止し、炭化水素を抽出してGC-MSで定量した。実験は2回以上行った。

2.3 結果

2.3.1 2つの酵素の結合について

AAR-ADO複合体の形成

先行研究では、73102AARと73102ADOが相互作用することが示唆されたが、73102ADOは二量体を形成しており、また、73102AARは凝集しやすいタンパク質として知られていた [Lin *et al.*, 2013; Warui *et al.*, 2015]。これに対し、好熱性細菌に由来するタンパク質は、一般に、中温性細菌に由来するタンパク質よりも安定であり、可溶性が高く、凝集しにくいことが知られている [Razvi *et al.*, 2006]。そこで、AARとADOタンパク質の凝集体形成を避けるために、本研究では、好熱性のラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来AARとADO (*TeAAR*, *TeADO*と略す) を使用した。

まず*TeAAR*と*TeADO*が相互作用するかどうかを確認するために、*TeAAR*と*TeADO*をそれぞれ単独で大腸菌を用いて発現させ、高純度精製した。次に、*TeAAR*単独、*TeADO*単独、および、2つの酵素を混合したサンプルについて、ゲルろ過 (SEC) 実験を行った。このとき、先行研究で73102AARと73102ADOの相互作用の解析に使用されたのと同じバッファー条件を用いた。各サンプルの溶出時間を比較した結果、*TeAAR*は13.3分、*TeADO*は13.8分に溶出された (図3 (A))。分子量が既知の標準試料の溶出時間と比較すると、これらの溶出時間は、約30 ~ 40kDaに相当する。この結果は、*TeAAR* (39.4 kDa, 353残基) と*TeADO* (27.3 kDa, 241残基) の分子量と一致しており、両タンパク質が単量体の状態で得られたことを示している。したがって*TeADO*は、二量体を形成する73102ADO [Warui *et al.*, 2015] よりもADOの物理化学的特性を調べる上で適している。

同じ濃度の*TeAAR*と*TeADO*を混合したサンプルをSEC分析すると、溶出時間12.8分に新たなピークが観察された。これは*TeAAR*と*TeADO*が相互作用し、複合体を形成していることを示唆している。そこで、両者が実際に結合することを確認するために、両方のタンパク質を3通りのモル比で混合し、SECカラムにアプライした (図3 (B))。どの場合も溶出時間約12.8分にピークが観察された。また、AAR量とADO量の割合が変化することにより、このピークの強度も変化した。濃度依存的なピークの強度変化は、溶出時間12.8分のピークがAAR-ADO複合体のピークであることを示している。

さらに、分子量を測定できる光散乱 (right-angle light scattering, RALS) 検

出装置をSECカラムの下流に接続し、各ピークの絶対分子量を測定した (図4)。AARとADO単独でのピークは、それぞれ40.1 (± 0.7) kDaと26.8 (± 0.6) kDaの分子量であるという結果が得られ、単量体のAARとADOの計算された分子量 (それぞれ39.4 kDaと27.3 kDa) と一致していた。また、AAR-ADO複合体に対応するピークの分子量は、66.5 (± 4.8) kDaであり、1 : 1で AAR-ADOが結合した分子量の計算値 (66.7 kDa) とほぼ同じであった。これらの結果から、*Te*AARと*Te*ADOが相互作用して、1 : 1の結合比で複合体を形成していることが明確に示された。

AAR-ADO相互作用の塩濃度依存性

AARとADOの相互作用を調査するために、分析SECを使用してAAR-ADO結合の塩濃度依存性を測定した (図5)。AARとADOを1 : 1で混合したサンプルをカラムにアプライすると、より低い塩濃度のときにAAR-ADO複合体のピーク強度が高くなることが分かった (図5)。また、塩濃度が高くなるほど、14 ~ 15分の間に溶出するADO単独のピークが高くなっており、AARと結合しにくくなることを示している。さらに、250 mM NaClでは、AAR-ADO混合液の主要なピーク位置は、AAR単独のピーク位置とほぼ一致していたことから、AAR-ADO複合体はほとんど存在していなかった。

以上の結果は、AARとADOの相互作用は、塩濃度が高いと弱まり、塩濃度が低いと強まることを示している。一般に、静電相互作用は塩濃度に強く依存し、塩濃度が高いと静電しゃへい効果によって静電相互作用が弱まるということが知られている。AARとADOの結合は、これと同様の挙動をしていた。したがって、本研究により、AAR-ADO複合体が静電相互作用によって安定化されることが示唆された。

2.3.2 相互作用部位の探索

ADO上のAAR結合部位

次に、結晶構造が既知であるADO上のどの部位にAARが結合するのかを探索した。長鎖アルデヒドは水に対しての溶解度が低く、ミセルを形成するため [Li *et al.*, 2012]、基質であるアルデヒドをADOに効率的に移動させるためには、AARがADOの基質進入部位周辺に結合することが予想される。ADOの基質進入部位は、ヘリックスH6 ~ H8に囲まれた領域と推定されている (図2 (A)) [Buer *et al.*, 2014]。したがって、AARが結合する部位はADOの

H6 ~ H8の領域にあると予測される。また、上記2.3.1の結果から、AAR-ADO結合において静電相互作用が重要であることが示唆された。したがって、ADOのヘリックスH6 ~ H8の荷電性残基がAARの結合に関与している可能性が高い。

そこで、AARの結合に関与するADOの残基を探索するために、ADOのヘリックスH6 ~ H8にある13個の荷電性残基 (Asp, Glu, His, Lys, Arg) をアラニンに置換した変異体の活性を測定した (図2 (B))。所属研究室の先行研究により、73102ADOの活性を、7942AARと共発現させた大腸菌を用い、*in vivo*の系で簡便に測定する方法が開発されている [Hayashi *et al.*, 2015; Kudo *et al.*, 2016; Kudo *et al.*, 2019a]。そこでこの変異解析においては、73102ADOを用いて13種類の変異体を作製し、それぞれ大腸菌で7942AARと共発現させ、大腸菌内で合成された炭化水素 (ペンタデカン (C15:0)、ヘプタデセン (C17:1)、ヘプタデカン(C17:0)) の総量を、大腸菌内での可溶性ADOの量で規格化して、ADOの活性の指標とした (詳細は2.2 方法を参照)。この実験では、AARとADOを大腸菌内で共発現しているため、AARとADOの間の相互作用を弱める変異が導入されたならば、AARからADOへの基質伝達の効率が低下して、合成される炭化水素の量が減少し、見かけ上のADOの活性が低下すると期待される。得られた結果を見ると、13種類のアラニンスキャン変異体のうち、E201A変異体の活性が最も低く、野生型ADOの活性の50%未満であった (図6; この博士論文では、ADO中のアミノ酸の残基番号を、73102ADOにおける残基番号で表記している。TeADOと73102ADOのアミノ酸配列の比較は、図7を参照)。また、D188A変異体は変異によって活性が野生型ADOの約60%に減少した。

AARが結合する部位の残基は、ADOの内部に埋もれているのではなく、表面に露出している可能性が高い。そこで、ADOの各残基の露出度を調べた。MOLMOLソフトウェア [Koradi *et al.*, 1996] を使用して、各アミノ酸残基が溶媒と接触している表面積を結晶構造から計算し、変性状態での溶媒露出表面積と比較して、式(5)のように露出度 (accessible surface area, ASA) (%) を計算した。

$$ASA [\%] = \frac{\text{結晶構造での溶媒露出表面積}}{\text{変性状態での溶媒露出表面積}} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

ただし、73102ADOまたはTeADOの結晶構造は知られていないので、9313ADOの結晶構造 (PDB ID: 2OC5) を用いてASAを計算した (図6)。その結果、D188はほとんどADOの内部に埋もれており、AARとの結合が難しい

ことが示唆された。また、ADOの結晶構造は、D188がR24と塩橋を形成していることを示していた (図8)。これらの結果から、D188A変異体では、R24との静電引力が失われたことによってタンパク質構造が不安定化し、ADOの活性が低下したと考えられる。したがって、AARがADOのD188に結合するとは考えにくい。一方、E201はASAが38%であり、溶媒に露出している残基である (図6)。したがって、ADOのE201は、AARが結合する残基の候補と考えられる。

AARとADO-E201A変異体の相互作用

ADOのE201がAARとの結合に関与しているかどうかを調べるために、73102ADOのE201A変異体に相当する*Te*ADOの変異体を精製し (図7, 9)、分析SECを行った。*Te*ADO-E201A変異体は、約13.8分に単一のピークとして溶出され (図4, 10)、変異体のタンパク質が単量体であることが示された。また、ADO-E201A変異体をAARと混合して分析SEC測定を行い、AAR-ADO複合体を形成するのかどうかを確認した結果、AAR-ADO複合体に対応するピークは観察されなかった (図10)。この結果は、ADOのE201A変異体がAARと結合しないことを明確に示しており、ADOのE201残基がAARの結合に必須であることが示唆された。

ADO-E201A変異体のCDスペクトルと熱安定性

上記のように、ADO-E201A変異体とAARの結合は観測されなかった。その有力な理由は、ADOのE201がAAR結合部位であるということだが、しかし、変異によってADOの構造が不安定化して変性し、AARと結合できなくなった可能性もある。後者の可能性を排除するために、円二色性分散計を用いて*Te*ADO野生型とE201A変異体の全体的な構造と安定性を測定した。CDスペクトル測定により、タンパク質の二次構造である α ヘリックスや β シートの存在を確認することができる。一般にタンパク質が α ヘリックスを持つ場合、208 nmと222 nmの波長で極小値を持つ。実際、野生型ADOのCDスペクトルは208 nmと222 nmに極小値を持っており、ADOが8本の α ヘリックスから構成されているという結晶構造と一致している (図11 (A)) [Khara *et al.*, 2013; Buer *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016]。ADO-E201A変異体のCDスペクトルを測定した結果、野生型ADOのCDスペクトルと一致していることがわかった (図11 (A))。したがって、ADOの全体的な二次構造は、E201A変異体においても維持されることが示された。

また、ADOの熱安定性を調査するために、222 nmでのCD値の温度変化を

測定してADOの熱変性曲線を得た。その結果、*Te*ADOの野生型と変異体ともに、40 °C以下で天然状態を維持し、それ以上の温度ではやや変性していたが、90 °Cでも完全には変性していなかった (図11 (B))。すなわち、ADOの野生型とE201A変異体は、同様の熱安定性を持っているか、あるいは、50 °C以降での変性はE201A変異体の方がやや高温側で起きていたことから、E201A変異体の方がやや安定かもしれないことが示唆された。したがって、ADO-E201A変異体は、野生型と同様の立体構造と安定性を保持していることが示された。以上のことから、E201A変異体がAARと結合しない理由は、変異によってADOが変性したためではなく、ADOのE201がAARの結合部位あるためであることが明らかになった。

ADOの*in vitro*での活性測定

最後に、E201A変異体がAARの結合のみに影響を与え、ADO自体の活性に影響を及ぼさないことを確認するために、AAR不在の条件下で、ADOの野生型およびE201A変異体の*in vitro*での炭化水素合成量を測定した。基質としては、低濃度のoctadecanalを使用し、ミセル形成を最小限に抑えた。その結果、ADOの野生型とE201A変異体はともに、同じ程度に炭化水素を合成しており (図12)、ADO-E201A変異体は、野生型と同程度の活性を持つことが分かった。すなわち、ADOのE201は、AARがADOと結合する上で必須の部位であることが示された。

ここで、AARとADO-E201A変異体を大腸菌で共発現させたときの結果 (図6) を見ると、野生型ADOと比べ、ADO-E201A変異体では、炭化水素合成量が50%未満に減少していた。しかし、*in vitro*での活性測定では、E201A変異体も野生型と同等の活性を有していた (図12)。前者ではAAR-ADO間相互作用とADOの活性の両方が炭化水素合成量を決めるのに対し、後者ではADOの活性のみを見ている。したがって、前者と後者の違いは、AAR-ADO間相互作用に由来するものである。すなわち、これらの結果は、AARとADOが相互作用する場合には、しない場合と比べ、炭化水素合成率が約2倍に向上することを示している。この値は、野生型73102ADOによる*in vitro*での炭化水素合成が、73102AARがあると2倍に増加したという先行研究の報告と一致している [Warui *et al.*, 2015]。

2.4 考察と結論

本研究の結果は、ADO上のAAR結合部位がヘリックスH7のE201を含んでいることを示した。これは推定されているADOの基質進入部位 (ヘリックスH6~H8)の構成要素の一部である。E201は、様々なラン藻由来のADOで高度に保存されていることから [Kudo *et al.*, 2019a]、AAR結合に重要な残基であることが示唆される。ヘリックスH6に位置する疎水性残基W179およびL182は、基質進入部位の中心に位置し、疎水性の基質との相互作用を促進すると言われている [Buer *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017]。したがってAARは、基質入口の右側と左側の端に対応するADOのヘリックスH6とH7に結合し、溶解度の低い長鎖アルデヒドを溶媒に露出せずに、ADOの疎水性トンネルに挿入すると考えられる (図13)。

疎水性相互作用は長鎖アルデヒドを結合するのに必要なため、AAR-ADO相互作用には静電相互作用が使われることは合理的である。もし疎水性相互作用がAAR-ADO相互作用にも関与している場合には、疎水性基質である長鎖アルデヒドがADO上のAAR結合部位と相互作用してしまい、ADOの内部に入れなくなる可能性がある。またはADOの基質進入部位の中心の疎水性残基とAARが結合することによってADOの基質入口に基質が入れなくなる可能性がある。それゆえ、AAR-ADO相互作用に疎水性相互作用が使われることは考えにくい。

静電相互作用はpHにも依存するため、AARとADOの結合はpHに依存するだろう。通常pH ~ 5になるとGluの負電荷が失われ、E201を介した静電相互作用は働かなくなるはずである。しかしADOについては、先行研究により、pH 6以下で活性が低下することが報告された [Wagh *et al.*, 2014]。これはGluのプロトン化よりも高いpHで起きている。おそらく、ADOの反応中心において、2つの鉄原子を配位しているHis残基がプロトン化され、鉄原子が解離してしまうために活性が低下したと考えられる [Buer *et al.*, 2014]。したがって、pH低下によるADOの活性低下は、AAR-ADO相互作用の低下に起因するものではない。

酵素の中には、2つの活性部位を持ち、それらがトンネルで接続されていて、中間産物が外部に触れることなく2段階反応をするものがある [Huang *et al.*, 2001]。例えば、*Salmonella typhimurium*のトリプトファン合成酵素の場合、最初の活性部位で合成された不安定な中間体は、トンネルを経由して二番目の活性部位に効率的に伝達される [Hyde *et al.*, 1988]。AAR-ADO複合体においても、同様の方法で作用して、反応性が高く、かつ、可溶性の低い長鎖アルデヒドをAARからADOに伝達するためのトンネルを作っている可能性がある。

また、トリプトファン合成酵素では、生成物の出口が二番目の活性部位の近くに存在し、基質と生成物は、一方向でのみトンネルを通過することができる。ADOの場合には、生成物である炭化水素が放出される方法は未解明である。ヘリックスH6 ~ H8に囲まれた基質進入部位を通して生成物が放出される場合には、

AAR-ADO複合体は、生成物を放出するために解離する必要があり、AARとADOの結合と解離反応が、ADOの触媒サイクルに含まれることになる。これは酵素反応としては非効率的であろう。一方、生成物がADOの他の部位から放出される場合には、触媒サイクル中にADOがAARから解離する必要はなく、両者の密接な結合は、ラン藻や大腸菌内での炭化水素合成を向上させると期待される。このメカニズムの解明は、今後の興味深い研究テーマとして残されている [Chang *et al.*, 2020]。

2.5 図

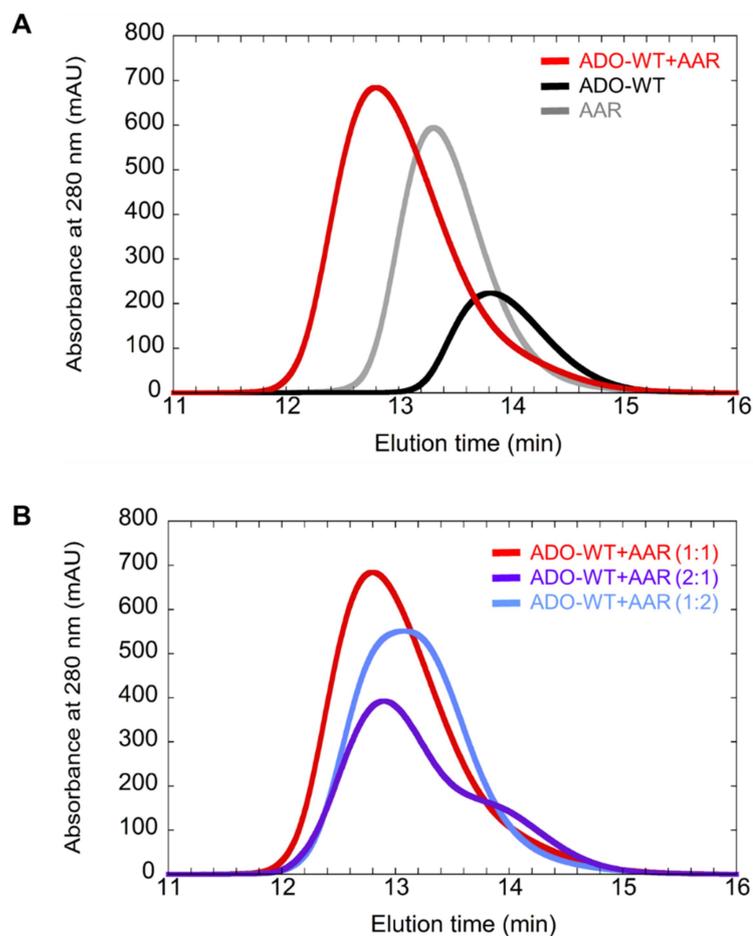


図3. 野生型ADOとAARの混合液のSEC溶出プロファイル

- (A) 赤：野生型ADO (50 μ M) とAAR (50 μ M) の1 : 1混合液
グレー：AARのみ (50 μ M)
黒：ADOのみ (50 μ M)

赤のグラフをみると、新しいピークが12.8分に存在する。これはAARとADOが結合して複合体を形成していることを示す。

- (B) タンパク質濃度依存性を調べたもの。

赤：野生型 ADO (50 μ M) とAAR (50 μ M) の1 : 1混合液
青：野生型ADO (33 μ M) とAAR (67 μ M) の1 : 2混合液
紫：野生型ADO (67 μ M) とAAR (33 μ M) の2 : 1混合液

3つの溶出プロファイルすべてでAAR-ADO複合体に相当する12.8分のピークが存在し、そのピークの強度が、タンパク質濃度に依存していた。

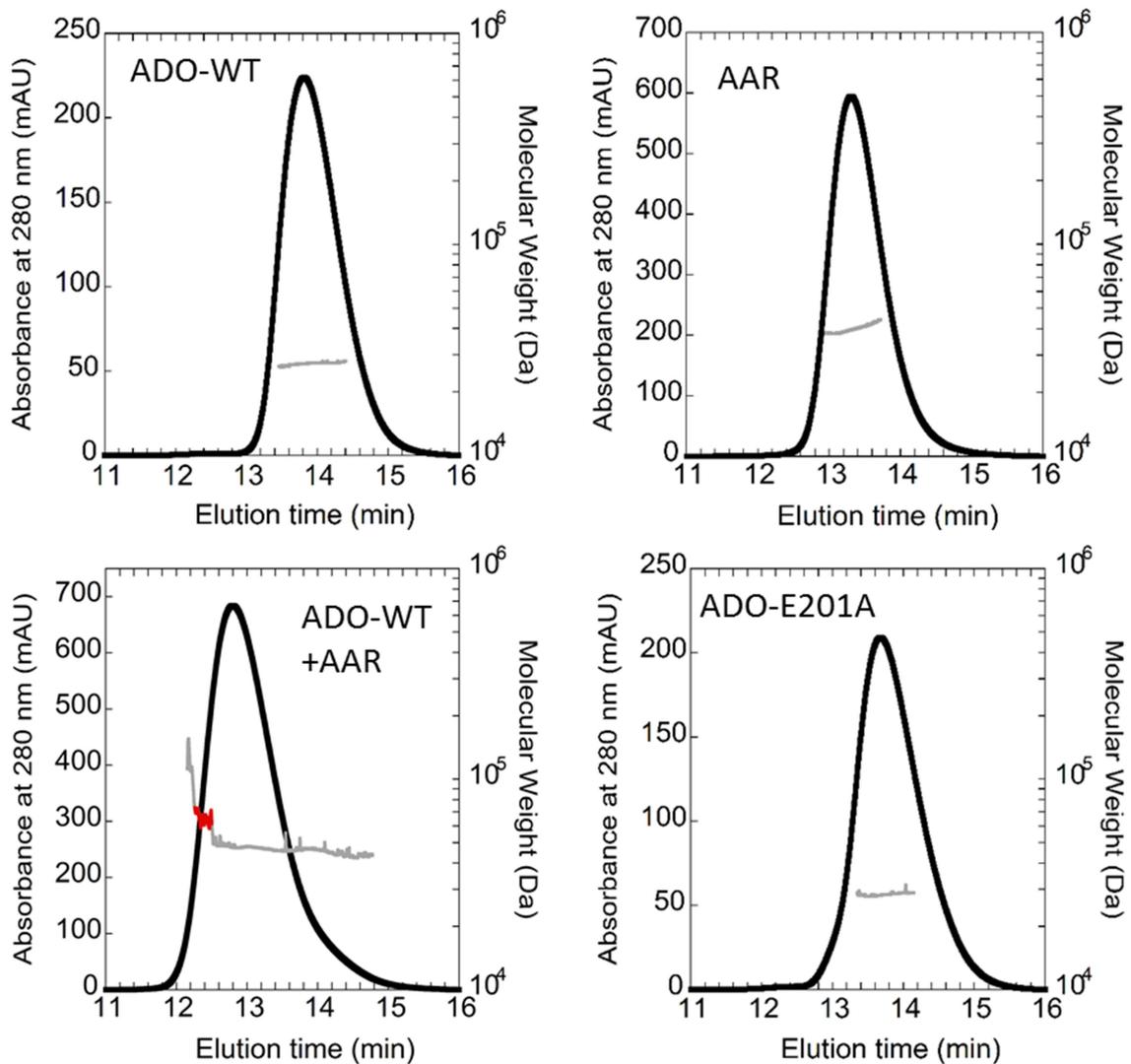


図4. ADOの野生型および変異体とAARのSEC溶出プロファイル（黒）とRALSで測定された分子量（グレー）

RALS測定で得られた野生型ADO, AAR, ADO-E201Aの分子量は、それぞれ 26.8 (± 0.6) kDa, 40.1 (± 0.7) kDa, 28.8 (± 0.5) kDaであり、いずれも単量体と考えられる。

AAR-ADO複合体が存在している部分(赤)を解析し、AAR-ADO複合体の分子量は 66.5 (± 4.8) kDaであり、AARとADOが1:1で結合していることが示唆された。

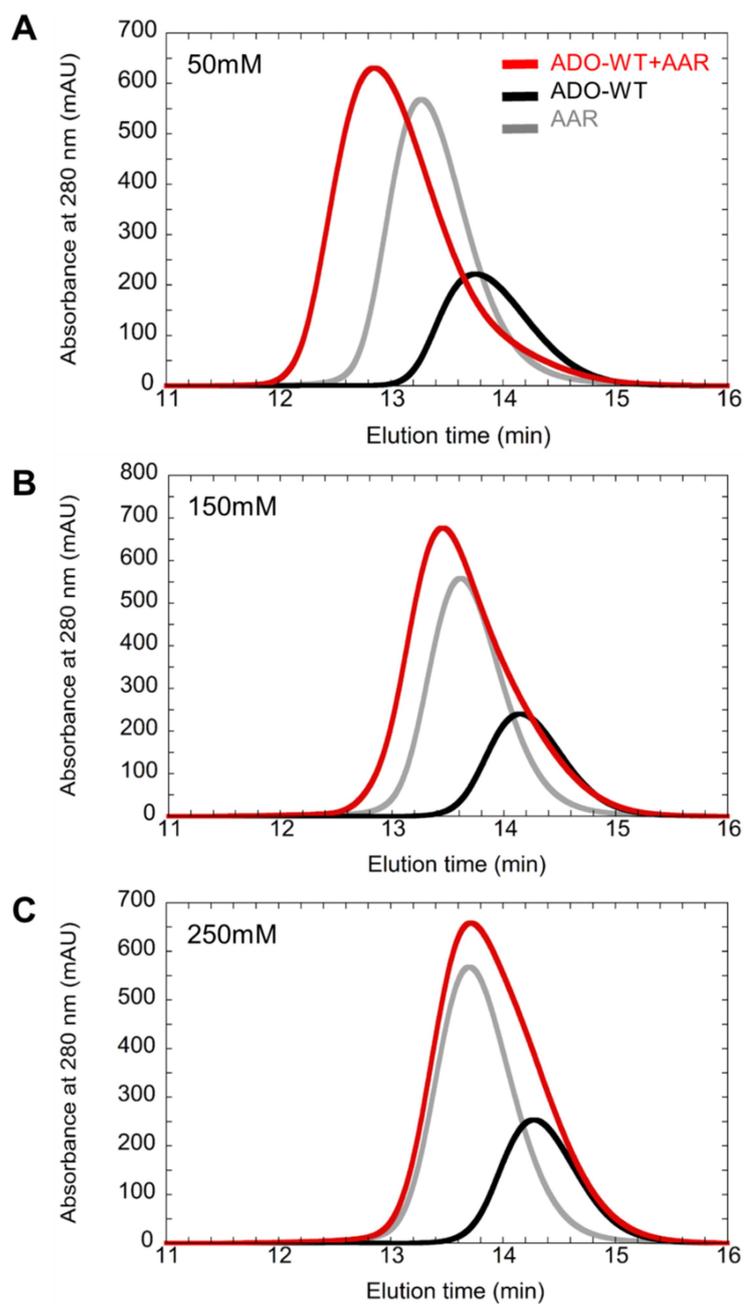


図5. 野生型 ADO (黒), AAR (グレー), 野生型ADOとAARの混合液 (赤) のSEC溶出プロファイル

各タンパク質濃度は、36 μ Mである。NaCl濃度は50 mM (A), 150 mM (B), 250 mM (C) である。

塩濃度が高くなるほど複合体を形成するピーク (赤) がAARのピークに近づいていた。これは、塩濃度が高いほど複合体を形成しにくいことを示す。

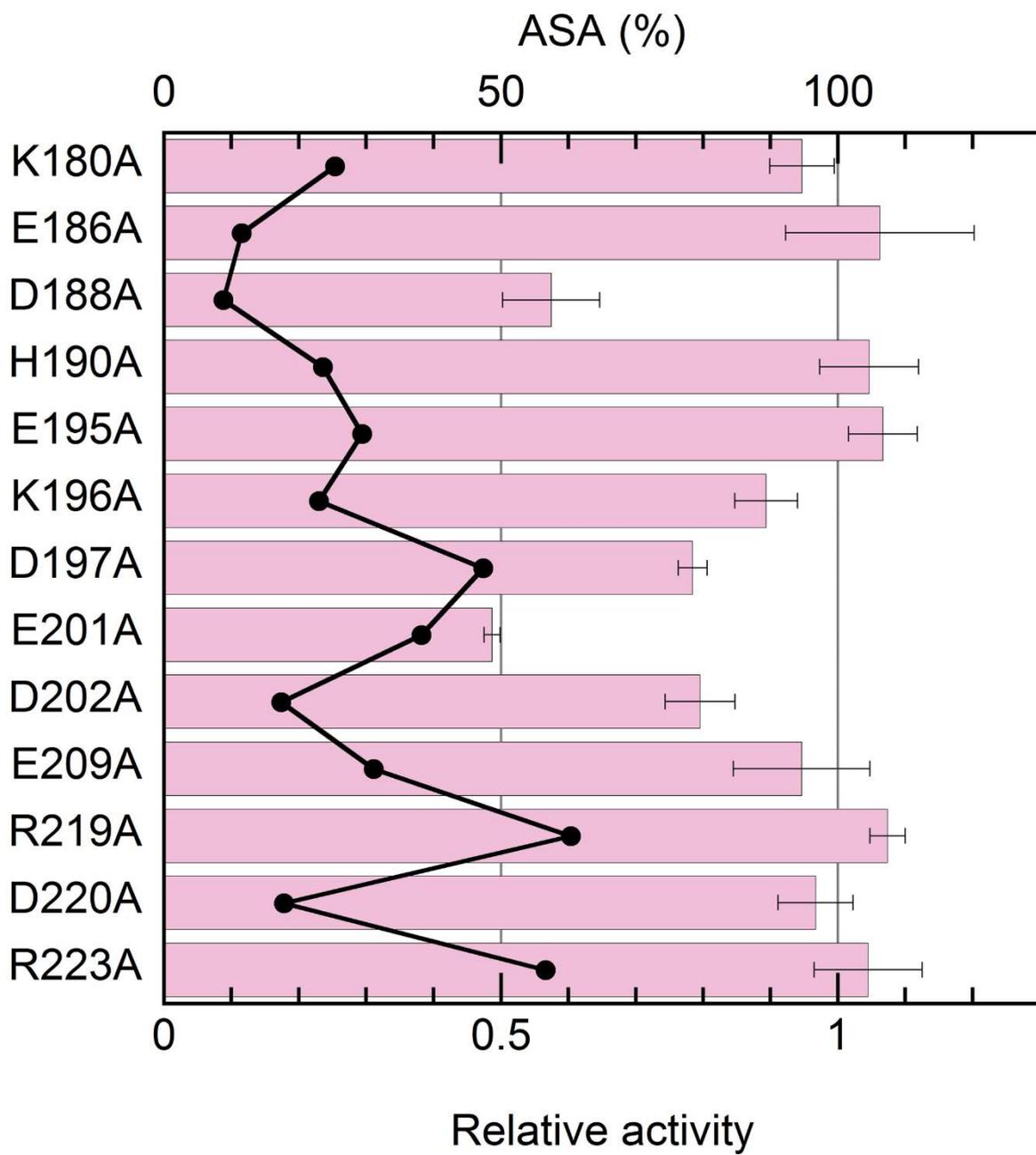


図6. ADOのヘリックスH6 ~ H8の荷電性残基におけるアラニンスキャン変異解析と各残基の露出度

ピンクの棒グラフは、野生型ADOの活性を1としたときの、ADO変異体の活性(相対値)を表す。3回の測定による平均±標準誤差を表示してある(下側の目盛り)。

黒球は9313ADOの結晶構造における各残基の露出度(ASA(%))を示す(上側の目盛り)。

```

*   *   :   **::*: *****:*** **::**
TeADO MTTAT-ATPVLDYHSDRYKDAYSRINAIVIEGEQEAHDNYIDLAKLLPQH
NpADO MQQLTDQSKELDFKSETYKDAYSRINAIVIEGEQEAHENYITLAQLLPES
1.....10.....20.....30.....40.....50

::** **::**::*****:*****:*** ** . *: *** * *
TeADO QEELTRLAKMEARHKKGFACGRNLSVTPDMEFAKAFFEKLRANFORALA
NpADO HDELIRLSKMESRHHKGFACGRNLAVTPDLQFAKEFFSGLHQNFQTAAA
.....60.....70.....80.....90.....100

*** . *****:*** . *****:*** ***** . ***:*****
TeADO EGKTATCLLIQALIIESFAIAAYNIYIPMADPFARKITESVVKDEYSHLN
NpADO EGKVVTCLLIQSLIIECFIAIAAYNIYIPVADDFARKITEGVVKEEYSHLN
.....110.....120.....130.....140.....150

***:***** . * .*** ** ***:***** . **:::*****
TeADO FGEIWLKEHFESVKGEELEENRANLPLVWKMLNQVEADAKVLGMEKDALV
NpADO FGEVWLKEHFAESKAELRLANRQNLPIVWKMLNQVEGDAHTMAMEKDALV
.....160.....170.....180.....190.....200

***** . ** .***:***:***:*.*** **
TeADO EDFMIQYSGALENIGFTTREIMKMSVYGLTGA
NpADO EDFMIQYGEALSNI GFSTRDIMRLSAYGLIGA
.....210.....220.....230..

```

図7. *Te*ADOと73102ADO (*Np*ADO) のアミノ酸配列の比較

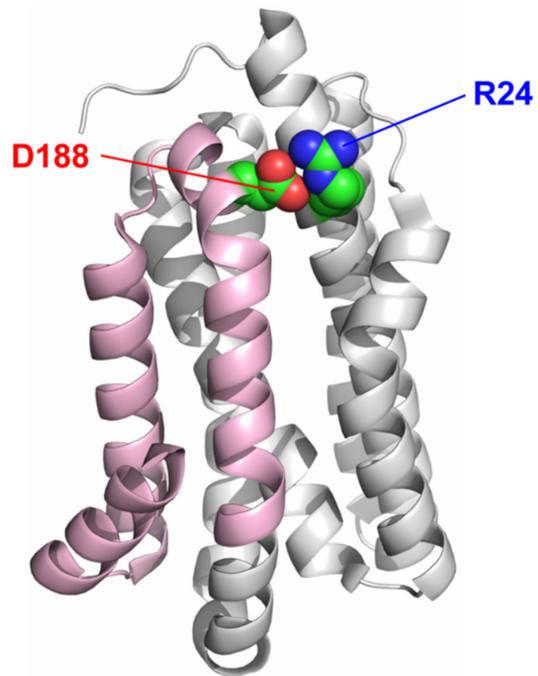


図8. R24とD188に塩橋が形成された9313ADOの結晶構造

緑、赤、青はそれぞれ炭素、酸素、窒素原子を表す (PDB ID: 2OC5)。ピンクは基質進入部位であるヘリックスH6～H8を示す。

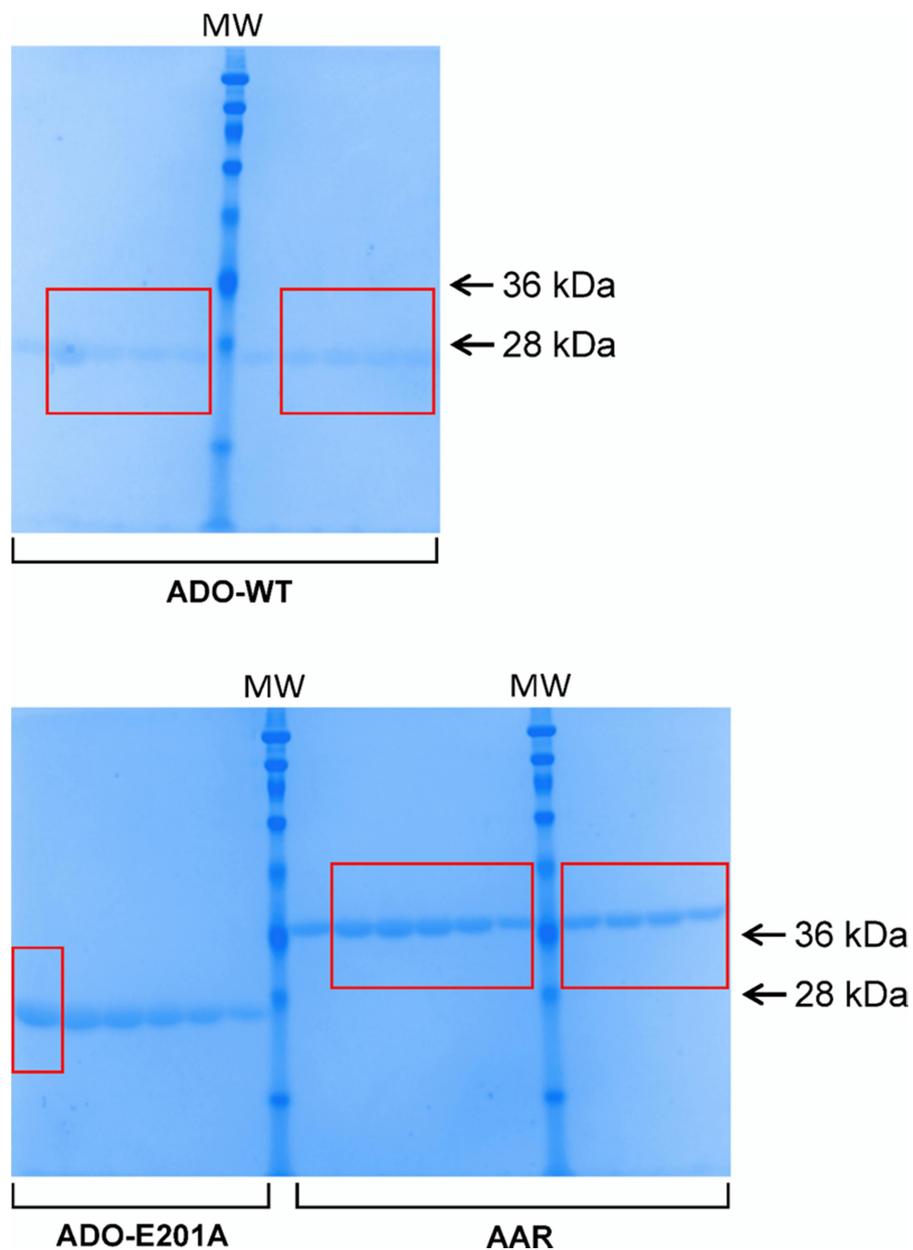


図9. 精製されたADO-WT, ADO-E201A, AARのSDS-PAGE

MWは分子量マーカーのレーンを表す。28 kDaと36 kDaのマーカーの位置は矢印で示されている。赤い四角ボックスに含まれるタンパク質を分析SECとCD測定に使用した。すべてのタンパク質が高純度に精製されたことがわかる。

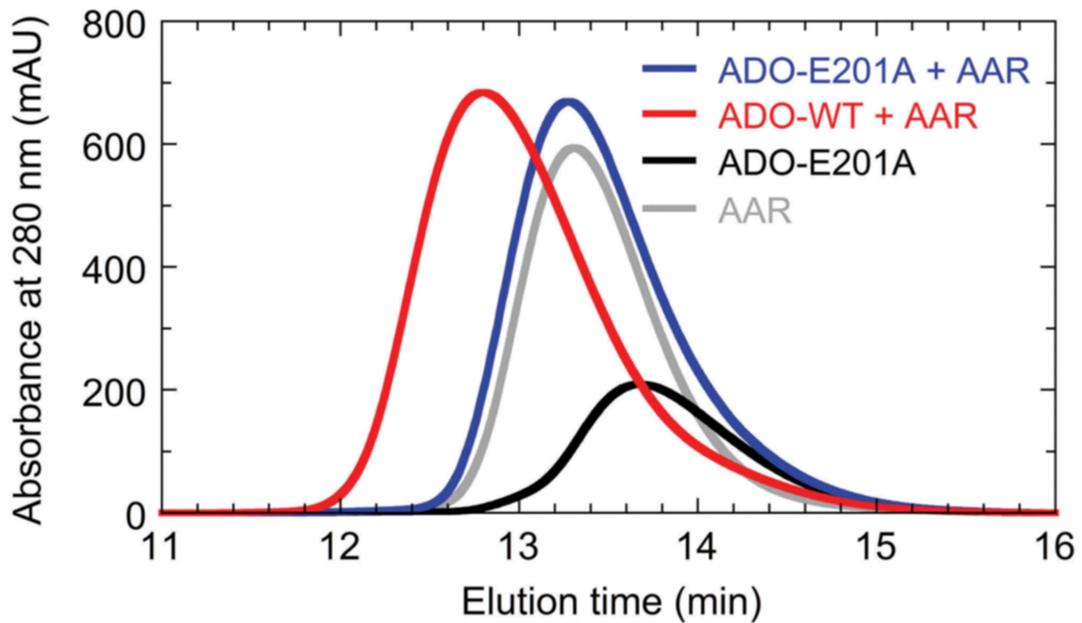


図10. ADOの野生型またはE201A変異体とAARのSEC溶出プロファイル

黒：ADO-E201A変異体のみ

青：ADO-E201AとAARの混合液

グレー：AARのみ

赤：野生型ADOとAARの混合液

タンパク質濃度は全て、50 μ Mである。

ADO-E201A変異体とAARの混合液の溶出プロファイルでは、野生型ADOとAARの混合液の溶出プロファイルとは異なり、12.8分のピーク (AAR-ADO複合体に相当するピーク) が存在していない。したがって、ADO-E201A変異体は、AARと複合体を形成しないことを示す。

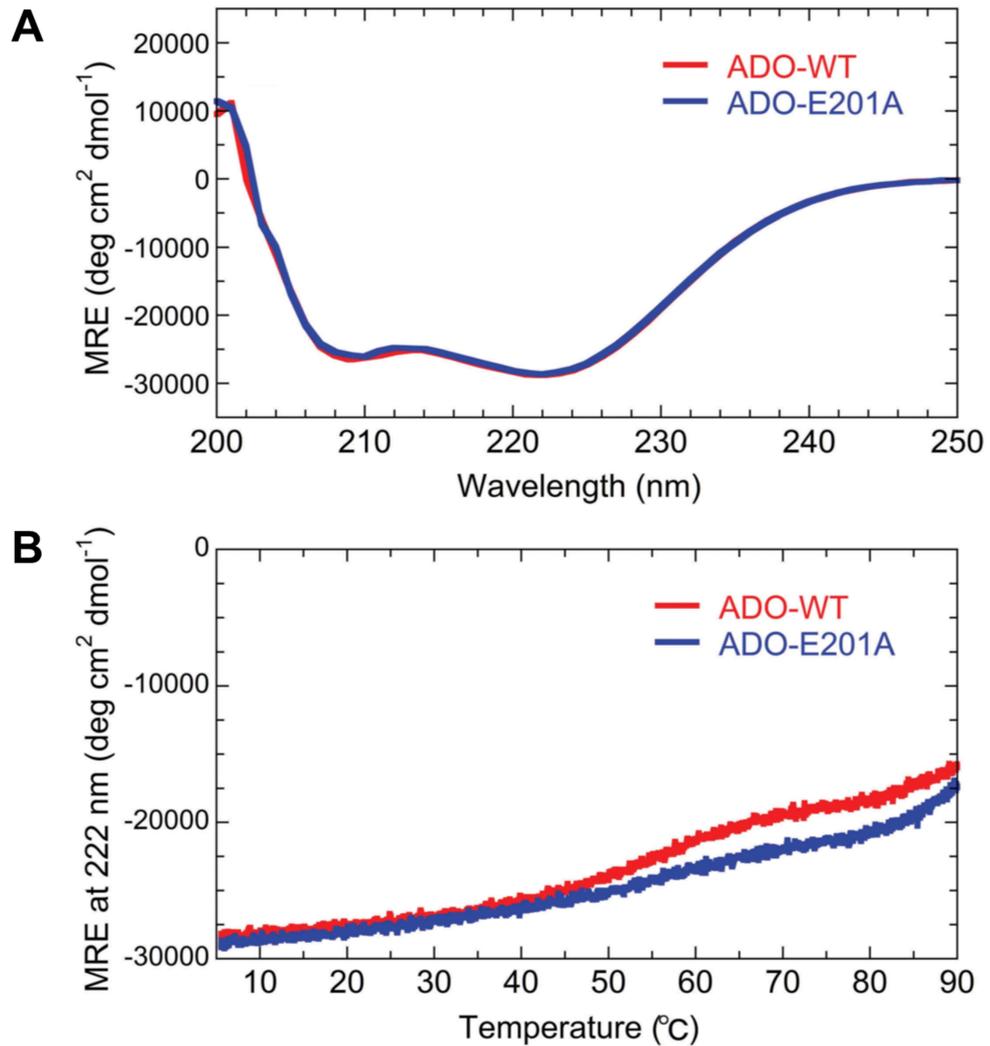


図11. 野生型 ADO (赤), ADO-E201A (青) のCDスペクトル (A) と熱変性曲線 (B)

- (A) 2つのADOのCDスペクトルは、ともに208 nmと222 nmに極小を持っていた。また、2つのADOの平均残基楕円率 (MRE) は同じであった。したがって、ADOの野生型とE201A変異体は、同様の二次構造を持つことが示唆される。
- (B) 5 °Cから95 °Cまでの熱変性の様子を222 nmの平均残基楕円率 (MRE) で測定した。ADOの野生型とE201A変異体は、ほぼ同じ熱安定性を持つ (あるいはE201A変異体のほうがやや安定) と考えられる。

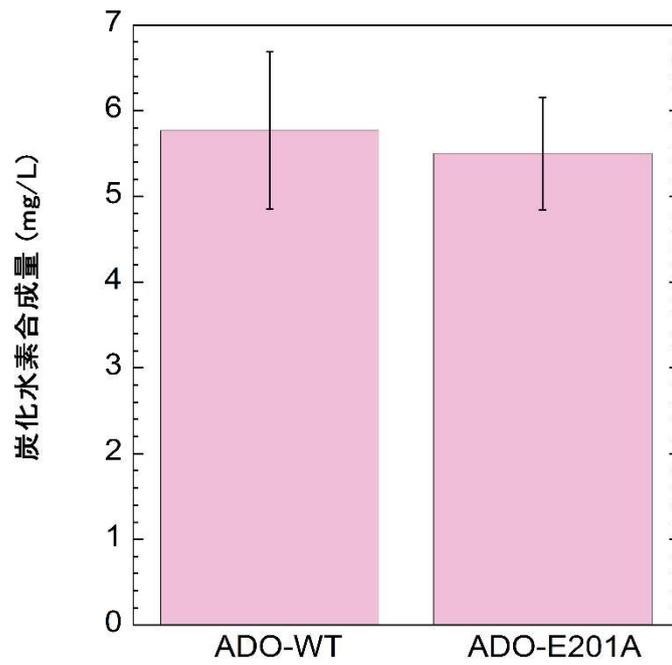


図12. ADOの野生型とE201A変異体の*in vitro*での炭化水素合成量の比較

AARが存在しない状態で、基質であるアルデヒドを添加して、ADOの野生型とE201A変異体の*in vitro*での炭化水素合成量を測定した。

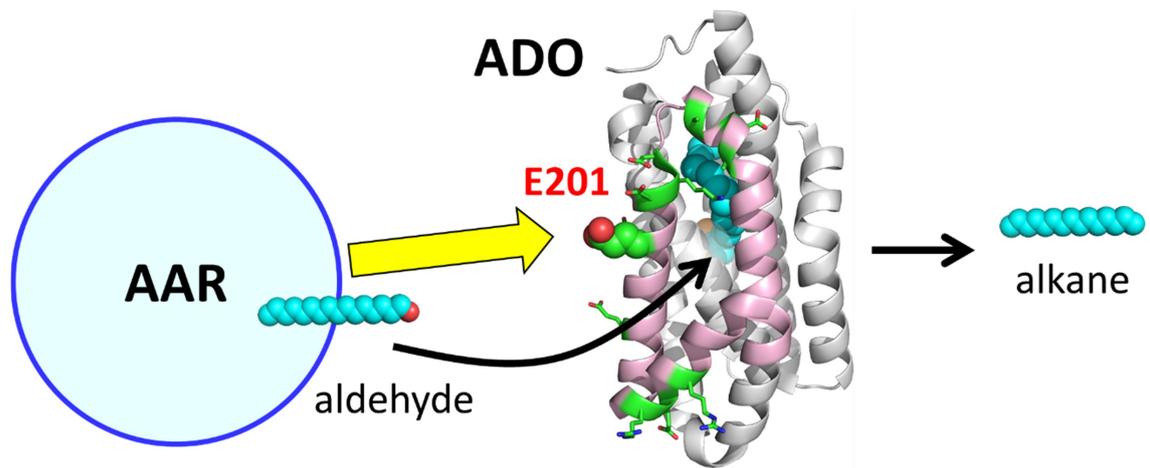


図13. ラン藻 (シアノバクテリア) がアルカンを合成する際には、ADO-E201とAARが静電相互作用によって結合し、AARからADOへと長鎖アルデヒドが効率的に伝達される

第3章 アルカン合成酵素ADOの変異解析

本章については、5年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開。

第4章 結論

本研究では、大きく分けて2つのテーマで研究を行った。最初のテーマでは、2つの酵素AARとADOの相互作用について調べた。両酵素の結合には静電相互作用が重要であり、1:1の割合で結合することが示された。また、ADOのE201部位はAARと結合する部位であり、これが結合に必須な残基であることが示唆された。E201はADOのヘリックスH7に存在することから、AARはADOの基質進入部位 (ヘリックスH6 ~ H8) 周辺に結合することがわかった。さらに、ADO-E201A変異体は、単独では野生型ADOと同程度の活性を持つが、AARと結合しないと、*in vivo*での炭化水素合成活性が半分に落ちることが示された。このことは、2つの酵素の結合は炭化水素合成において重要な要素であることを示唆している。一方、もし両者の結合が強くなった場合には活性が高くなるのかどうかは不明である。今後、両者の結合を強化させた変異体を作製して活性を測定し、2つの酵素の相互作用についてさらに詳しく検討したい。

二つ目のテーマについては、5年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開する。

第5章 参考文献

Andre C, Kim SW, Yu XH, Shanklin J (2013) Fusing catalase to an alkane-producing enzyme maintains enzymatic activity by converting the inhibitory byproduct H₂O₂ to the cosubstrate O₂. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(8): 3191-3196

Arai M, Hayashi Y, Kudo H (2018) Cyanobacterial enzymes for bioalkane production. In: Zhang W, Song X, editors. *Synthetic Biology of Cyanobacteria*. Singapore: Springer Singapore; p. 119-154.

Buer BC, Paul B, Das D, Stuckey JA, Marsh ENG (2014) Insights into substrate and metal binding from the crystal structure of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase with substrate bound. *ACS Chem Biol*. 9: 2584-2593

Brennan L, Owende P (2010) Biofuel from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev*. 14: 557-577

Carr CM, Kim PS (1993) A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* 73(4): 823-832

Chang M, Shimba K, Hayashi Y, Arai M (2019) Electrostatic interactions are essential for binding of two enzymes in cyanobacterial alkane biosynthesis. *Biosci Biotech Biochem*. 84(2): 228-237

Coates RC, Podell S, Korobeynikov A, Lapidus A, Pevzner P, Sherman DH, Allen EE, Gerwick L, Gerwick WH (2014) Characterization of cyanobacterial hydrocarbon composition and distribution of biosynthetic pathways. *PLoS One* 9: e85140

Das D, Eser BE, Han J, Sciore A, Marsh EN (2011) Oxygen-independent decarbonylation of aldehydes by cyanobacterial aldehyde decarbonylase: a new reaction of diiron enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 50(31): 7148-7152

Eser BE, Das D, Han J, Jones PR, Marsh EN (2011) Oxygen-independent alkane formation by non-heme iron-dependent cyanobacterial aldehyde decarbonylase: investigation of kinetics and requirement for an external electron donor. *Biochemistry* 50: 10743-10750

Hayashi Y, Yasugi F, Arai M (2015) Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase. *PLoS One* 10(4): e0122217

Huang X, Holden HM, Raushel FM (2001) Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*. 70: 149-180

Hyde CC, Ahmed SA, Padlan EA, Miles EW, Davies DR (1988) Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*. 263(33): 17857-17871

- Jia C, Li M, Li J, Zhang J, Zhang H, Cao P, Pan X, Lu X, Chang W (2015) Structural insights into the catalytic mechanism of aldehyde-deformylating oxygenases. *Protein Cell* 6: 55-67
- Khara B, Menon N, Levy C, Mansell D, Das D, Marsh EN, Leys D, Scrutton N (2013) Production of propane and other short-chain alkanes by structure-based engineering of ligand specificity in aldehyde-deformylating oxygenase. *Chembiochem.*; 14(10):1204-1208
- Koradi R, Billeter M, Wuthrich K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph.* 14(1):51-5, 29-32
- Kudo H, Nawa R, Hayashi Y, Arai M (2016) Comparison of aldehyde-producing activities of cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductases. *Biotechnol Biofuels* 9: 234
- Kudo H, Hayashi Y, Arai M. (2019a) Identification of non-conserved residues essential for improving the hydrocarbon-producing activity of cyanobacterial aldehyde-deformylating oxygenase. *Biotechnol Biofuels* 12, 89
- Kudo H, Hayashi Y, Arai M. (2019b) Improving hydrocarbon production by engineering cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductase. *Biotechnol Biofuels* 12, 291
- Li N, Chang W, Warui DM, Booker SJ, Krebs C, Bollinger JM Jr (2012) Evidence for only oxygenative cleavage of aldehydes to alk(a/e)nes and formate by cyanobacterial aldehyde decarbonylases. *Biochemistry* 51: 7908-7916
- Lin F, Das D, Lin XN, Marsh EN (2013) Aldehyde-forming fatty acyl-CoA reductase from cyanobacteria: expression, purification and characterization of the recombinant enzyme. *FEBS J.* 280(19): 4773-4781
- Park AK, Kim IS, Jeon BW, Roh SJ, Ryu MY, Baek HR, Jo SW, Kim YS, Park H, Lee JH, Yoon HS, Kim HW (2016) Crystal structures of aldehyde deformylating oxygenase from *Limnothrix* sp. KNUA012 and *Oscillatoria* sp. KNUA011. *Biochem Biophys Res Commun.* 477(3): 395-400
- Rahman Z, Sung BH, Yi JY, Bui LM, Lee JH, Kim SC (2014) Enhanced production of n-alkanes in *Escherichia coli* by spatial organization of biosynthetic pathway enzymes. *J Biotechnol.* 192: 187-191
- Razvi A, Scholtz JM (2006) Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci.* 15(7): 1569-1578
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 5: 725-738
- Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E, del Cardayre SB (2010) Microbial biosynthesis of alkanes. *Science* 329: 559-562
- Wang Q, Bao L, Jia C, Li M, Li J, Lu X (2017) Identification of residues important for the activity of aldehyde-deformylating oxygenase through investigation into the structure-activity

relationship. *BMC Biotechnol.*; 17(1): 31

Warui DM, Li Ning, Nørgaard Hanne, Krebs Carsten, Bollinger JM Jr, Booker SJ (2011) Detection of formate, rather than carbon monoxide, as the stoichiometric coproduct in conversion of fatty aldehydes to alkanes by a cyanobacterial aldehyde decarbonylase. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 3316-3319

Warui DM, Pandelia ME, Rajakovich LJ, Krebs C, Bollinger JM Jr, Booker SJ (2015) Efficient delivery of long-chain fatty aldehydes from the *Nostoc punctiforme* acyl-acyl carrier protein reductase to its cognate aldehyde-deformylating oxygenase. *Biochemistry* 54: 1006-1015

Waugh MW, Marsh EN (2014) Solvent isotope effects on alkane formation by cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase and their mechanistic implications. *Biochemistry* 53(34): 5537-5543

Winters K, Parker PL, van Baalen C (1969) Hydrocarbons of blue-green algae: geochemical significance. *Science* 163: 467-468

工藤 恒 (2016) 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 修士論文

榛葉 啓悟 (2017) 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 修士論文

第6章 謝辞

多くの方々に支えられ、本論文を執筆することができました。お世話になった皆様にお礼申し上げます。研究の遂行にあたり、全般にご指導して頂いた指導教員の
新井宗仁教授に深く感謝しております。実験、発表、論文の執筆にあたっては細部まで気を配っていただきました。研究以外にも東京での留学生生活を無事に終えることができるように気を配っていただきました。本当にありがとうございました。本研究の実験の方法やアドバイス、ディスカッション等をして頂いた助教の林勇樹先生にも深く感謝しております。タンパク質については何も知らなかった私に二人の先生は、多くのことを教えてくださいました。二人の先生から指導を賜り、光栄でした。また、この論文を審査して頂いた主査の能瀬聡直教授と副査の岡田康志教授、岡田真人教授、豊島陽子教授、矢島潤一郎准教授に深く感謝しております。論文に関しての様々なコメントを頂きました。有難う御座いました。

アルカン定量の実験やGC-MS装置の操作などを教えていただいた先輩の工藤恒さんに感謝しています。それ以外にも、AARのモデリング構造の情報をいただいたり、KEKで測定するためのサンプル準備やAAR-ADO複合体のモデリングなどを手伝ってもらったり、モデリングのやり方を教えてもらったりしました。また、KEKと一緒に実験を手伝ってくださった林先生と先輩の工藤さんと和田愛未さん、後輩の佐野美桜さん、季高駿士君、大岡紘治君には感謝しています。さらに後輩の季高君にはITC測定実験について教えてもらいました。研究室の皆さんにお世話になって感謝しております。研究室生活においては、研究室の同級生と先輩方のおかげで有意義な研究室生活を送ることができたことに深く感謝致します。最後に、学業への取り組みを常に支えてくれた母の尹毎子に心から感謝の意を表し、この場を借りて謝辞とさせていただきます。有難う御座いました。