研究ノート

分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体の構造と機能に関する比較 生化学:アフリカツメガエル Xenopus laevis のデカルボキシラーゼ α サブユニットの一次構造について

小野 和夫1)・ 高地 英夫2)

キーワード : 分岐鎖 α - ケト酸脱水素酵素複合体, デカルボキシラーゼ, 1次構造, cDNA クローニング, アフリカツメガエル

要旨:アフリカツメガエル(Xenopus laevis)の分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体デカルボキシラーゼ α サブユニット(E1 α)のcDNAクローニングを行い1次構造と機能の関連について検討した。その結果、アフリカツメガエルのE1 α は、400残基からなり、分子量は45,698と推定された。ヒトとの比較でアミノ酸配列全体での類似性は、91%であった。またサブユニット相互作用部位およびリン酸化部位と推定される配列の類似性は98%以上であった。以上のことからE1 α の構造と機能上、重要なアミノ酸(配列)は、動物種を超えて保存されていると考えられた。

はじめに

酵素は、細胞の代謝反応の効率を高めるように一定の局在性をもって細胞内に分散している。 そのなかで、一連の反応に関与する数種の酵素は、中間生成物の連続的受け渡しと化学変化を 円滑に効率よく行うことができるよう特定の立体配置で一定数分子集合して、"多酵素複合体" を形成することが知られている¹⁾。

分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体(BCKADC)は、分岐鎖アミノ酸代謝の律速酵素として機能し、真核生物ではミトコンドリアに局在する。 哺乳類の BCKADC は、触媒酵素成分として decarboxylase(E1)、 dihydrolipoyl transacylase (E2) および dihydrolipoamide dehydrogenase (E3)を含み、24分子の E2 が集合して形成された E2 コアに E1 と E3 がそれぞれ 12 および 6 分子結合して構成される。このうちチアミンピロリン酸(TPP)を補酵素とする E1 は、 $\alpha_2\beta_2$ のサブユニット構造をもち、E18 を介して E2 と結合すると考えられている。 E1 α はこの TPP 結合サイトのほか、特異的なリン酸化酵素および脱リン酸化酵素によりリン酸化・脱リン酸化されるセリン残基をもち BCKADC のオーバーオール活性の調節に関与する1,2)。

哺乳類と鳥類を除くと真核生物のE1の構造と機能についてはほとんど知られていない。我々は、両生類のアフリカツメガエル Xenopus laevis (XL) 肝ミトコンドリアの可溶化試料を抗

¹⁾山陽学園短期大学食物栄養学科

²⁾福島県立医科大学医学部生化学第一講座

ラット E1 抗体によりウエスタンブロットを行い、ブロット上 46K、37K および 36K の 3 つのタンパク質を検出した。これらの 3 種のタンパク質は、蔗糖密度勾配遠心によっていずれも E2 コアと結合することが確認されたことから、XL の E1 のサブユニットであることが強く示唆された 3 。そこで、これら 3 つのタンパク質が E1 のサブユニットとどのように関連するのかを明らかすることを目的として、cDNA クローニングにより $E1\alpha$ のT ミノ酸配列を調べた。 さらに XL の $E1\alpha$ の 1 次構造と機能との関連についても検討した。

方法

XLの $E1\alpha$ サブユニット cDNA のクローニングと塩基配列の決定は前報に準じて以下の方法で行った $^{4)}$ 。

先ず、 $E1\alpha$ について哺乳類とニワトリで完全に保存されているアミノ酸配列をもとにミックスプライマーを作成し、XL 肝の cDNA ライブラリーをテンプレートとして PCR を行った。得られた PCR 産物を pBluescriptKS+にライゲーション後、JM109 にトランスフォームした。組換え DNA をもつ大腸菌を定法により白コロニーとして選択した後、プラスミドを増幅、精製した。挿入断片の塩基配列は、T3 と T7 プライマー及び Sequi Therm II Long-Read sequencing Kit (EPICENTRE. TECHNOLOGIES)を用いて2本鎖 DNA のシーケンスにより決定した。このようにして cDNA の中央部分の塩基配列を決定した後、得られたクローンの 3'側に相補的なプライマーおよび cDNA が挿入されている λ phage のマルチクローニングサイトの塩基配列の一部をプライマーとして PCR を行い、得られた PCR 産物を同様にクローニングし cDNA の 3'側の塩基配列を決定した。さらに cDNA の 5'側の配列についても同様に決定した。

結果と考察

cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を図1に示す。cDNAのシーケンスの結果から成熟型 $E1\alpha$ のN末端はThr33と考えられた(図1)。またLys432の直後にTAA(mRNAでは終始コドンに相当)存在することからC末端はLysであると考えられた(図1)。これらの結果から、XLの $E1\alpha$ はヒトやウシの $E1\alpha$ と同様に400アミノ酸残基からなり、分子量は45,698と推定された。従って、イムノブロット上、抗ラットE1と反応した3つのたんぱく質のうち、46Kのものが $E1\alpha$ サブユニットに相当すると考えられる。 また36Kおよび37Kのタンパク質はE18サブユニットと関連することが強く示唆される。

哺乳類および鳥類 (ニワトリ) の成熟型 **E**1αとのアミノ酸配列の比較を図2に示した。動物種間でアミノ酸配列を比較すると**XL**の**E**1αサブユニットは、哺乳類および鳥類のサブユニットとアミノ酸レベルで高い類似性をもつ (ヒトとの比較では類似性が91%) (図2)。このことは、動物種を超えて**E**1の構造と機能が保存されていることを示している。

E1はTPPを補酵素とし、 $\alpha_2\beta_2$ のヘテロテトラマー構造をとり、C末端付近のチロシン残基 (特にTyr368) はE18との結合に必須の残基である可能性が指摘されている $^{5)}$ 。また、E1の活性中心は α と β サブユニットの接触面に形成され、ここにE1 α のTPP結合領域が配置される $^{2)}$ 。このうちヒトE1 α ではAsn222がTPPおよびMg $^{2+}$ との結合に関与する $^{2)}$ ので、XLにおいても保存されているAsn222がその機能を担うと考えられる。

BCKADCのオーバーオール活性はE1のリン酸化/脱リン酸化により調節され 2), このためのリン酸化部位は、 $E1\alpha$ に2箇所存在し(ヒトE1ではSer292およびSer302), このうちSer292

のリン酸化によりE1活性の90%以上が失われる 6 。XLにおいてもこれらのSer292およびSer302に対応するSer残基が完全に保存されている(図2)。

このように哺乳類におけるTPP結合モチーフ,サブユニット相互作用部位およびリン酸化部位の1次構造²⁾が,両生類のXLにおいても極めてよく保存されていることから,XLのE1αは構造および機能上,哺乳類および鳥類のものと相同であると考えられる。

1	GCGGCGCTAAGGGCACTTCTAAGGGTCCGAACTGTGGCAGGAAGGTGGAGAGCCGCCGGTGGGAGACAGAC	
	GAATTCACTTCCTTGGAGGAGAAACCACAATTCCCTGGAGCTTCAGCTGACTTTGTGGAGTCGTTGGAATTCATCCAGCCCAATGTTA	
181 61	TCTGGGATTCCTATTTACCGTGTCATGGACCGCCAAGGACAGATTATCAACCCAAGTGAAGACCCCAAAATTCCGAAAGAGAAAGTCGS G I P I Y R V M D R Q G Q I I N P S E D P K I P K E K V	
	AAGTTTTATCATACTATGACTCTGCTGAACACCATGGACAGGATTTTATATGAATCTCAGAGACAGGGAAGAATTTCCTTCTACATGA	
	AACTATGGAGAGGAGGACACATGTAGGCAGTGCAGCAGCACCTCTGCAAGACACAGACCTTGTTTTGGACAGTACAGAGAAGCAGGTC N Y G E E G T H V G S A A A L Q D T D L V F G Q Y R E A G	
	CTGATGTATCGGGGTTATCCTCTGGATCGTTTTATGGCTCAGTGTTATGGAAATGCCTCAGACCCAGGAAAAGGAAAAGGAAAATGCCTCL M Y R G Y P L D R F M A Q C Y G N A S D P G K G R Q M P	
541 181	CACTATGGCTGCAAGGACTTGAATTTTGTTACCATCTCCTCTGCTGGCAACTCAGATCCCCCAGGCTGTGGGTGCAGCGTATTCTTH Y G C K D L N F V T I S S P L A T Q I P Q A V G A A Y S	TT 630 F 210
	AAACGGGAGAATGCAGACCGTGCTGTCATTTGCTACTTTGGCGAGGGTGCAGCCAGTGAAGGAGATGCACATGCTGCCTTCAACTTC K R E N A D R A V J C Y F G E G A A S E G D A H A A F N F	
	GCTACTCTGGAGTGTCCTGTTTTATTCTTTTGCAGAAATAATGGATATGCAATATCTACACCAACCTCTGAGCAATACAGGGGAGATAA T L E C P V L F F C R N N G Y A I S T P T S E Q Y R G D	
	ATTGCGGCTCGTGGTCCTGGATATGGTATCCTGTCAATACGAGTGGATGGTAATGATGTTTTGCCGTGTACAATGCTACTAAAGAGGIA A R G P G Y G L L S I R V D G N D V F A V Y N A T K E	
901 301	CGACGCAGAGCAGTAGCAGAATCAGCCGTTCCTTATAGAGGCCATGACATACAGGATTGGACATCACAGTACCAGTGATGACAGCCRRRRAVA EN QPFLIEAMTYRIGHHSTSDDS	
961 321	GCATACCGCTCAGTTGATGAGGTTAATTACTGGGATAAGCAGGATCATCCTATTTCTCGGCTTCGTAACTACATGTTACACAAGGGC A Y R S V D E V N Y W D K Q D H P I S R L R N Y M L H K G	
1081 361	TGGGATGAGGAGCAGGAGAAAAAAAATCACGCAAGATGGTCATGGAAGCATTTGAAGAGGCTGAACGAAAGCATAAAAWDEEQEEAEKIWRKSRKMVMEAFEEAERKHK	The second second
1141 381	AAATTGGAGCACATGTTTTCAGATGTATACTCAGAAATGCCTGCTCAGTTAAGGAAACAAGAACAAAATCTAATGAAACATCTAAAAACK L E H M F S D V Y S E M P A Q L R K Q E Q N L M K H L K	
	TATGGAGAACATTACCCTTTGGACAGCTTTGAGAAGTAACCCATTTGTGGTTCCTTACAAGGAATATTTCTGTTACAGGCAAATACTCY G E H Y P L D S F E K	TG 1350 432
1351	GATATTGGGCACTTCATCTTGCCCAACTTAACAGCCTGCTGCAAGAACCTTACCTATTAATCAGTGCAAATAATTCCTTCTCTTTTTC	TG 1440
1441	AAATCATTTTATTAGATAATTAATTTGGTTGTAAATAAAAGGTTAGAAAGATTTTTT	TG 1530
1531	TTTATACTATATTAATATACTGTATAAGCC CTATGGTTACATATGCAGGAAGCCCATGGTAATCTAATTTGCTGGTTGACTATTAA	AT 1620
1621	AATGGAAATGGAACAAAGTAGTTTGTTGTTTTTTAGATGCAATAACCTATTAAAGGTCCATTAACACAAAGAAATAAAGAGTGCATT	AC 1710
1711	ACATAAAAAAAAAA	1725

図 1 アフリカツメガエル $E1\alpha$ サブユニット cDNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 図中の下線部および二重下線部は、ミトコンドリア移行シグナルおよびポリアデニル化 シグナルをそれぞれ示す。

Xenpus	laevis	1	TSLEEKPO	FPGASADFVE	SLEFIQPNVI	SGIPIYRVMD	RQGQ11NPSE	DPKIPKEKVL	KFYHTMTLLN	TMDRILYESO		78	
	Numan	1	-SSLDDKPQ	FPGASAEF 10	KLEF I QPNV I	SG1PTYRVMD	ROGOT INPSE	DPHLPKEKVL	KLYKSMTLLN	TMDRILYESO.		78	
1	Bov ine	1	-SSLDDKPQ	FPGASAEF ID								78	
	Rat			FPGASAEFVD								79	
	Mouse			FPGASAEFVO	*1			DPHLPOEEVL				79	
(S)	ricken	,	DEPSLEEKPU	FPGASAEFAD	RLEFTOPNVI	SGIPVYRVMD	RUGHTVSPSE	DPOLPKELVL	KLYKIMILLN	IMURILYESU		80	
Xenopus	laevis	79	ROGRISFYMT	NYGEEGTHVG	SAAALQDTDL	VFGQYREAGV	LMYRGYPLDR	FMAQCYGNAS	DPGKGROMPV	HYGCKOLNFY		158	
	Human	79	ROGRISFYMT	NYGEEGTHVG	SAAALDNTDL	VFGQYREAGV	LMYRDYPLEL	FMAQCYGNIS	DLGKGROMPV	HYGCKERHFY		158	
	Bovine	79	ROGRISFYMT	NYGEEGTHVG	SAAALDDTDL	VFGOYREAGV	LMYRDYPLEL	FMAOCYGNVS	DLGKGROMPV	HYGCRERHFY		158	
	Rat			NYGEEGTHVG								159	
10.7	Mouse			NYGEEGTHVG								159	
(hicken	81	ROGRISFYMT	NYGEEGTHVG	SAAALDDTDL	VFGQYREAGV	LMYRGYPLDL	FMAQCYGNAS	DPGRGRQMPV	HYGCRERHFV		160	
		Thiamine Pyrophosphate Binding Motif											
Xenopus	laevis	159	TISSPLATOI	POAVGAAYSF	KRENADRAVI	CYFGEGAASE	GDAHAAFNES	ATLECPVLFF	CRNNGYAIST	PTSEQYRGDG		238	
	Human	159	TISSPLATOI	PQAVGAAYAA	KRANANRYVI	CYFGEGAASE	GDAHAGENEA	ATLECPTIFF	CRNNGYAIST	PISEOYRGUG		238	
	Bovine			POAVGAAYAA								238	
	Rat			POAVGAAYAA								239	
	Mouse			PQAVGAAYAA								239	
	hicken	161	TISSPLATOI	POAVGAAYAI	KRADASRAVI	CYFGEGAASE	GDAHAGENEA	AILECPIVEE	CRNNGYAISI	PISEOYRGDG		240	
		Putative Subunit Interaction Site Phosphorylation Site											
Xenopus	laevis	239	LAARGPGYGI	LSTRVDGNDY	FAVYNATKEA	RRRAVAENOP	FLIEANTYRI	GHHSTSDDSS	AYRSVDEVNY	WDKQDHP1SR		318	
	Human	239	JAARGPGY61	MSTRVDGNDV	FAVYNATKEA	RRRAVAENOP	FLIEAMTYRI	GHHSTSDDSS	AYRSVDEVNY	WDKQDHP1SR		318	
	Bovine			LSTRYDGNDV								318	
	Rat			MSIRVDGNDV								319	
	Mouse			KSIRVDGNDV								319	
	Chicken	241	TAARGPGYGL	MSIRVDGNDV	FAVYNATKEA	KKRAVAENUP	FLIEAMIYKI	GHHS1500SS	ATRSVDEVNY	WDKODHPISK		320	
Xenopus	laevis	319	LRNYMLHKGW	WDEEQEKIWR	KKSRKMVMEA	FEEAERKHKP	KLEHMFSDVY	SEMPAGLRKQ	EQNLMKHLKL	YGEHYPLDSF	EK	400	
	Human	- 7/12/	mention bearing a feet	WDEEQEKAWR	TANK ALL OF STATE STATE OF	The second could have	The Benney AV. 5 S.	water of the Court	Care Street or the St.	of the party end on the	20.0	100	
	Bovine			WDDEQEKAWR									
	Rat			WDEEQEKAWR									
	Mouse		military and controller	WDEEOEKAWR	Transcription of a country	C. of the State of Contract Co.	Definition and Addition		-denie merine in female i	Chamber of the hard			
- (hicken	321	LRHYMQGRGW	WDEEQEKGWR	KSSRKKVMEA	FEGAERKPKP	NPOHLESDVY	REMPPNLRRQ	RAALERHLOH	YGEHYPMELY	EK	402	

図2 動物種間でのサブユニットのアミノ酸配列の比較

cDNA の塩基配列から推定されるアフリカツメガエル *Xenopus laevis* (XL) の成熟型 E1 α の アミノ酸配列を哺乳類(ヒト、ウシ、ラット、マウス)および鳥類(ニワトリ)と比較した。 XL の配列上の網掛けされた残基は、比較した動物種間で完全に保存されていたものを示す。

謝辞

本研究は、山陽学園大学・短期大学学内研究補助(平成27年度)を受け、遂行されました。 心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Perham RN, Packman L: 2-Oxo acid de- hydrogenase multienzyme complexes: Domains, Dynamic and Design. *Ann NYAcad Sci*, **513**, 1-20 (1989)
- 2) Chuang DT et al: Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria): An

- update. The Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, eds Scriver CR, et al. (McGraw Hill, New York), pp 1–42 (2008)
- 3) Ono K: Properties of the decarboxylase component of *Xenopus laevis* branched-chain α-keto acid dehaydrogenase complex. *Bulletin of Sanyo Gakuen College* . **40**, 1-8 (2009)
- 4) Ono K *et al*: cDNA cloning of the chicken branched-chainα-keto acid dehaydrogenase complex: Chicken-specific residues of the acyltransferase affect the overall activity and the interaction with the de hydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **68**, 727-736 (2001)
- 5) Wynn RM *et al*: Structure, function and assembly of mammalian branched-chain α-ketoacid dehydrogenase complex. In "Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes" (ed by Patel MS, Roche TE, Harris RA), Birkäuser Verlag, Basel, pp 101-117 (1996)
- 6) Zhao Y *et al*: Site directed mutagenesis of phosphorylation sites of the branched chain α-keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem*, **269**, 18583-18587 (1994)