

アミノピルビン酸アミノトランスフェラーゼの結晶構造解析 X-ray structural analysis of amine pyruvate aminotransferase

管立軍¹, 宮川拓也¹, 伊藤紀幸², 八十原良彦², 田之倉優^{1,*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

²(株)カネカ フロンティアバイオ・メディカル研究所,

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8

Lijun Gun¹, Takuya Miyakawa¹, Noriyuki Ito², Yoshihiko Yasohara², Masaru Tanokura^{1,*}

¹ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

² Frontier Biochemical & Medical Research Laboratories, Kaneka Corporation, 1-8, Miyamae, Takasago, Hyogo 676-8688, Japan

1 はじめに

キラルアミンは、医薬、農薬、他の産業上有用な化合物の合成に利用されている。*R* 体選択的なアミノトランスアミナーゼ (*R*-ATA) は近年同定された希少な酵素であり、アミン化合物とカルボニル化合物との間でアミノ基転移反応を触媒するにより、様々な *R* 体アミンをもつ化合物の合成に応用が期待されている。本研究が対象とする *Arthrobacter* sp. KNK168 由来 *R*-ATA (Ab-*R*-ATA) はホモ二量体のピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性の酵素である。Ab-*R*-ATA は抗糖尿病薬と抗肥満薬の合成中間体として重要な (*R*)-3,4-ジメトキシアンフェタミンを合成することができる。また、米国 Codexis 社と Merck 社は経口血糖降下薬 sitagliptin の合成に適用できるように、Ab-*R*-ATA のホモログである ATA-117 の高機能化に成功した (ATA-117-Rd11)。ATA-117-Rd11 は、従来の基質よりも大きな置換基をもつケトン認識できる。この基質特異性の改変を導く構造基盤が理解されれば、さらに多様な基質を出発とした *R* 体キラルアミン合成への応用が期待される。

2 実験

タンパク質サンプルは大腸菌をもちいた発現系により生産し、Ni アフィニティー、陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。測定に用いた全ての結晶は、20°C で蒸気拡散法により取得した。抗凍結剤なしの条件下で、結晶を液体窒素下で凍結し、BL-5A 及び AR-NW12A ビームラインにおいて X 線回折実験を行った。波長 1.0000 Å、露光時間 1 秒、振動角 0.5 度、180 度の回折データセットをそれぞれ取得し、データ処理には XDS を使用した。Ab-*R*-ATA の立体構造は、Branched-chain amino acid aminotransferase (PDB ID 1IYE) を初期モデルとした分子置換法により決定した。

3 結果および考察

Ab-*R*-ATA, G136F 変異体及び ATA-117-Rd11 の結晶構造を分解能 1.65 Å, 2.20 Å, 2.27 Å で決定した[1]。

PLP 結合部位の近くに位置する Large binding pocket と Small binding pocket が基質特異性を決定していることを明らかにした。また、変異体解析と分子動力学シミュレーションにより、活性部位にある Arg138 がアミン化合物とカルボニル化合物の二重の基質認識に機能することが示された。ATA-117-Rd11 の結晶構造では、Ab-*R*-ATA の結晶構造と比べて活性部位にあるループの大きな構造変化が引き起こされており、それはループ上の Gly136 の置換によるものと推定された (図 1)。実際に Ab-*R*-ATA の G136F 変異体の結晶構造によりループの構造変化が確認され、活性測定によりループの構造変化が基質特異性に関わることが示された。

4 まとめ

本研究では、活性部位に位置するループが基質特異性の制御に重要であることを明らかにした。この構造情報は、多様な *R* 体キラルアミンの合成に利用可能な酵素設計に役立つと期待される。

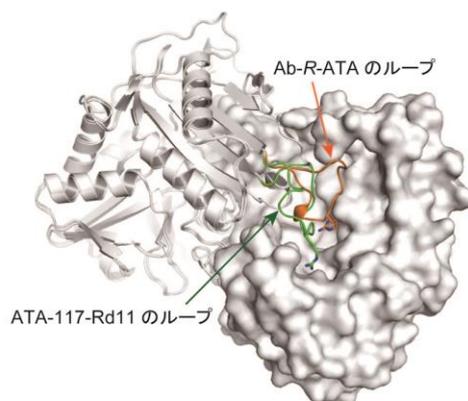


図 1 : *R*-ATA のループの構造変化

参考文献

[1] Guan, L.-J. *et al.*, *Sci. Rep.* **5**, 10753 (2015).

*amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp