

耐熱性カルボニル還元酵素の結晶構造解析と基質認識機構の解明

Crystal structure analysis of extremely thermostable carbonyl reductase and structural basis for substrate recognition

米田一成^{1,*}, 福田雄大¹, 櫻庭春彦², 大島敏久³

¹東海大学農学部バイオサイエンス学科, 〒862-8652 熊本県熊本市東区鹿渡 9-1-1

²香川大学農学部応用生物科学科, 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

³大阪工業大学工学部生命工学科, 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5 丁目 16-1

Kazunari Yoneda¹, Haruhiko Sakuraba², Yudai Fukuda¹, Toshihisa Ohshima³

¹Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

²Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, Japan

³ Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

1 はじめに

カルボニル還元酵素(CR, EC: 1.1.1.184)はアルデヒド、ケトンあるいはキノンなどの様々なカルボニル化合物の酸化還元反応を触媒する NAD(P)H 依存性の酸化還元酵素である。CR はあまりに基質特異性が広い酵素であるため、生体内において毒物などの生体異物を分解あるいは排泄するための代謝反応に広く関与する酵素であることが推測されているが、本来の生理的意義はほとんど明らかにされていない。これまでに分子量や酵素化学的諸性質が異なる多様な CR が様々な生物種から発見されているにも関わらず、全ての CR は短鎖型脱水素酵素/還元酵素ファミリー (SDR ファミリー) に属している。

我々はゲノムデータベースを利用し、好熱菌由来の CR ホモログ遺伝子を検索した結果、超好熱菌 *Aeropyrum pernix* K1 (最適生育温度 95°C) に、CR をコードしていると予測される遺伝子(ORF ID: APE_2503.1)を見出し、本酵素のクローニングおよび機能解析を行った結果、本酵素が高度耐熱性を有す CR であり、また 4-クロロアセト酢酸エチル (COBE) を良好な基質とすることを明らかにした。超好熱菌由来の CR の報告例はこれまでに無く、安定性の高い CR は有用なキラル化合物合成などへの有効利用が期待できると考えられる。本酵素はすでに NADPH との 2 者複合体の X 線結晶構造解析を行い、NADPH の認識機構や安定化のメカニズムを明らかにしているが、基質複合体結晶の作成や立体構造解析には至っておらず、基質認識に関わる詳細な分子メカニズムの情報は不明のままである。そこで、本研究では *A. pernix* CR-NADPH-酒石酸 (基質アナログ) の 3 者複合体の構造決定を行うとともに、CR の基質認識機構および反応機構を考察した。

2 実験

超好熱菌 *A. pernix* K1 由来 CR の大腸菌を用いた発現、精製は Fukuda らの方法に従って行った[1]。精製酵素を 5.1 mg/ml まで濃縮後、還元型補酵素である NADPH を終濃度 0.2 mM になるように加え、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化スクリーニングを行った。クライオプロテクタント (抗凍結剤) にはエチレングリコールを選択し、結晶化条件に終濃度 30% (V/V) になるようにエチレングリコール溶液を加え実験に用いた。X 線の波長は 1.00 Å, 振動角度は 1 イメージにつき 1°, 結晶から検出器までの距離は 213.91 mm に設定にした。データの処理には HKL2000 を用いた。

3 結果および考察

結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、Crystal Screen No. 29 (0.1 M HEPES バッファー pH 7.5, 0.8 M L-(+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物) の条件での単結晶の析出が確認できた。更に、沈殿剤である酒石酸の濃度を 0.4-1.0 M の範囲で条件展開することで単結晶を作成することに成功した。本結晶を用いて X 線回折実験を行ったところ、最高分解能 1.80 Å であり、空間群は *P6₁22* であった。

得られた X 線回折データを元に分子置換法を用いて、*A. pernix* 由来 CR の NADPH-基質アナログ 3 者複合体の位相決定を行った。分子置換のプログラムには MOLREP を用いた。サーチモデルには *A. pernix* 由来 CR-NADPH の 2 者複合体の立体構造データ (PDB code = 5B1Y) を用いた。最終的に *A. pernix* 由来 CR-NADPH-酒石酸の 3 者複合体を *R* 値 = 0.225, *free R* 値 = 0.234 で構造決定することに成功した[2]。非対称単位中にはホモダイマーが 1 分子存在しており、494 アミノ酸残基、2 分子の NADPH、2 分子の酒石酸、490 の水分子で構成されていた (図

1)。MOLPROBITY を用いたラマチャンドランブロットの解析の結果、全てのアミノ酸残基が許容範囲内であった。モノマー構造はロスマンフォールドドメイン (N 末ドメイン) と触媒ドメイン (C 末ドメイン) の2つで構成されていた。

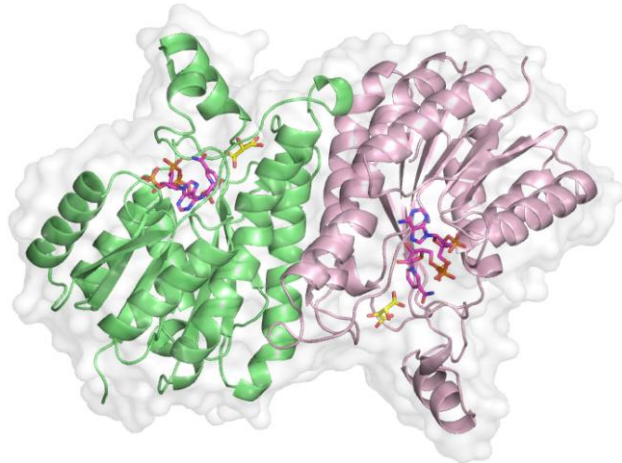


図 1 : *A. pernix* K1 由来のダイマー構造

活性中心に結合している酒石酸の C1 カルボキシル基は触媒残基である Ser141、Tyr155 の側鎖と水素結合しており、酒石酸の C4 カルボキシル基は Arg248 の側鎖および Val150、Ala151 の主鎖の NH と水素結合していた (図 2)。また、酒石酸のカルボニル基は Arg248 の側鎖と相互作用することを明らかにした。触媒残基である Lys159 は NADPH のニコチンアミドリボースのヒドロキシル基との水素結合していた (図 2)。得られた酒石酸複合体の構造から C1 カルボキシル基の部分が CR の基質のカルボニル基の位置に相当するのではないかと予測されたため、活性中心に結合した酒石酸 (基質アナログ) の配向から CR の酵素反応産物である (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル[(S)-CHBE]の結合モデルを構築し、これまで不明であった基質結合に関与するアミノ酸残基を同定した。モデリングの結果、(S)-CHBE のヒドロキシル基は触媒残基である Ser141、Tyr155 の側鎖と水素結合しており、(S)-CHBE のカルボニル基は Arg248 の側鎖と水素結合していた (図 3)。また Val150 が (S)-CHBE の酸素原子および疎水性のエチル基と相互作用することが予測され、S 体選択的に反応が可能な配向で (S)-CHBE が *A. pernix* 由来 CR の触媒部位に結合することが示唆された (図 3)。補酵素 NADPH のニコチンアミド-リボース間の結合が *syn* 型の構造であることから NADPH のピリジン環の C4 位からの水素転移は *si* 面 (*pro-S*; B-type) 特異的に起こると考えられることも S 体選択的に COBE の還元反応が可能な理由と考えられる。

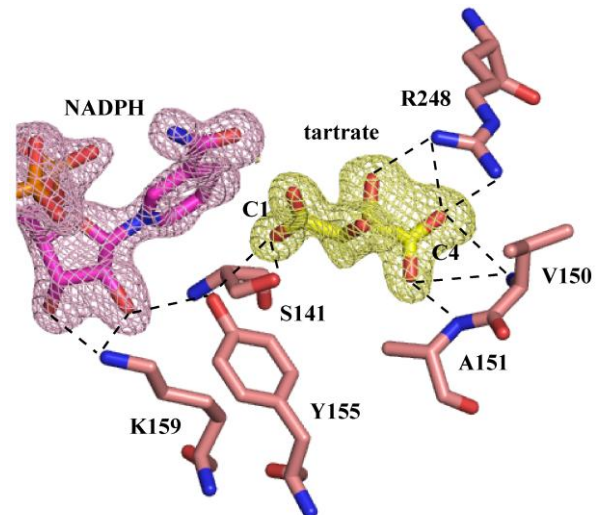


図 2 : NADPH 酒石酸 3 者複合体構造

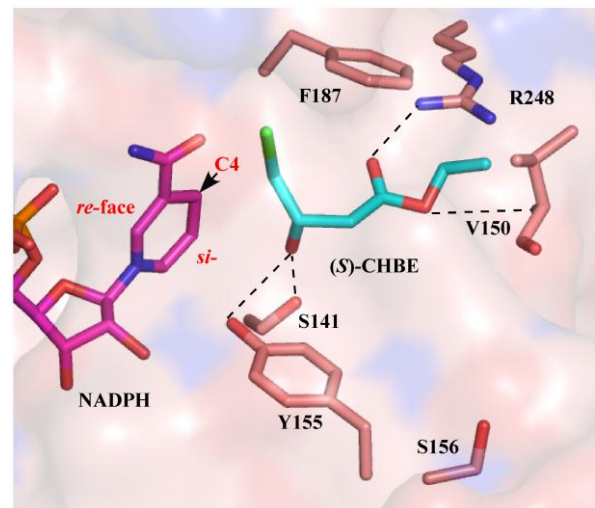


図 3 : (S)-CHBE 複合体構造

4 まとめ

本研究では超好熱アーキア *A. pernix* K1 由来の高度耐熱性 CR の NADPH-酒石酸 (基質アナログ) との 3 者複合体の結晶構造解析を行うとともに、CR の酵素反応産物である (S)-CHBE の構造を活性中心にモデリングすることに成功した。

参考文献

- [1] Y. Fukuda *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* (2016) **91**, 17-25.
- [2] K. Yoneda *et al.*, *Proceedings of School of Agriculture Tokai University* (2017) **36**, 1-6.

* kyoned@agri.u-tokai.ac.jp