

酸化発酵に関わる酵素の X 線結晶構造解析

X-ray crystallographic study of enzymes involved in the oxidative fermentation

野田 将平¹、金子 亮介¹、緒方 康平¹、

宮本 智也¹、岡崎 紗代子¹、平戸 祐喜²、後藤 勝^{1*}

¹ 東邦大学大学院理学研究科, 〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

² 日本大学大学院理工学研究科, 〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-5-1

Noda Syohei¹, Ryosuke Kaneko¹, Ogata Kohei¹,

Miyamoto Toshiya¹, Okazaki Sayoko¹, Hitato Yuki², Masaru Goto¹

¹ Graduate School of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan

² College of Science and Technology, Nihon University, 1-5-1 Kanda-Surugadai, Tiyoda-Ku, Tokyo 101-8308, Japan

1 はじめに

酢酸菌は、細胞膜のペリプラズム側に様々な膜結合型の脱水素酵素を発現させているため、外環境中の糖やアルコールなどの基質を細胞内に取り込むことなく酸化することができ、反応生成物の有機酸を外環境中に蓄積する「酸化発酵」を行うことができる。酢酸菌はグリセロールを添加すると成長が促進されることが良く知られているが、これは酸化発酵の過程で基質の酸化と共に基質から受け取った電子が、細胞膜の遊離ユビキノンへ伝達されることで呼吸鎖にも関与しているためである。ジヒドロキシアセトン (DHA) 発酵 (図 1) において、グリセロールは、膜結合型グリセロール脱水素酵素によって、DHA に還元され、還元された DHA は細胞内に取り込まれる。細胞内には、恒常的に発現している NADPH 依存性 DHA 還元酵素 (NADPH-DHAR) およびグリセロールによって発現が誘導される NADH 依存性 DHA 還元酵素がある。DHA はそれらに還元されたのち、様々な化学修飾を受け代謝される。

このような酢酸菌の DHA 発酵のメカニズムを分子レベルで理解するために、NADPH-DHAR である *Gluconobacter thailandicus* 3255 株由来の GTH1149 タンパク質の基質特異性の調査および X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

N 末端に His タグを付与した GTH1149 遺伝子を組み込んだ発現用プラスミド pET30a (N-His GTH1149) をもつ大腸菌 BL21 (DE3) 株を抗生物質のカナマイシンを含む LB 培地を用いて培養した。N-His GTH1149 の精製は TALON® Metal Affinity Resin カラムもちいたアフィニティークロマトグラフィーによって行った。

N-His GTH1149 の結晶は、PEG を主な沈殿剤とするリザーバーに対してハンギングドロップ蒸気拡散法を行うことで得た。N-His GTH1149 の X 線回折強度データは、PF-AR のビームライン NW12A, NE3A および PF のビームライン BL-1A, BL-5A, BL-17A にて収集した。N-His GTH1149 の回折データの処理とスケーリングは、プログラム HKL2000 または XDS と SCALA で行った。

GTH1149 の活性測定は 340 nm における NADP⁺/NADPH の吸光度変化を測定することによって行った。基質として、NADH 依存性 DHA 還元酵素の基質調査にもちいた DHA を含む 11 種類のアルコールもしくはケトンに加えて、シキミ酸および 5-ケト-D-フルクトース (5KF) を評価した。

3 結果および考察

GTH1149 は、測定した 11 種類アルコールもしくはケトンの中では DHA に対してのみ還元反応を触媒することが分かった。その比活性は 4.29 U/mg であった。また、GTH1149 は、DHA 還元逆反応であるグリセロール酸化を含め、これらの内のどの化合物に対しても酸化反応を触媒しないことが分かった。

GTH1149 のネイティブ構造は、1.95 Å 分解能で R_{factor} 値および R_{free} 値が、それぞれ 17.42 % および 24.48 % の精度で決定された (図 2)。立体構造の相同性を検索するプログラム DALI での解析により、GTH1149 の全体構造はシキミ酸デヒドロゲナーゼ (SKDH) のそれと似ていることが分かった。しか

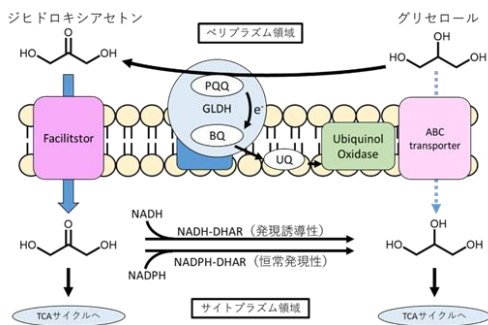


図 1 : DHA 発酵の模式図

し、シキミ酸に対する酸化反応の活性測定を行ったところ GTH1149 はその反応を触媒しないことが分かった。

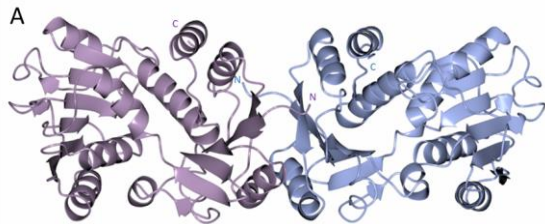


図 2 : GTH1149 の全体構造

Thermus thermophilus HB8 由来 SKDH と NADP⁺ およびシキミ酸との三者複合体の構造 (PDB entry : 2ev9) と GTH1149 の構造を重ね合わせてみたところ、SKDH の基質であるシキミ酸の認識に関わる 8 残基のうち GTH1149 には 6 残基が保存されているが、SKDH の Ser14 残基と Tyr207 残基が GTH1149 では Asn21 残基と Pro227 残基に置換されていることが分かった (図 3)。このことから GTH1149 は SKDH に比べてより広い活性部位キャビティを有することが示唆される。

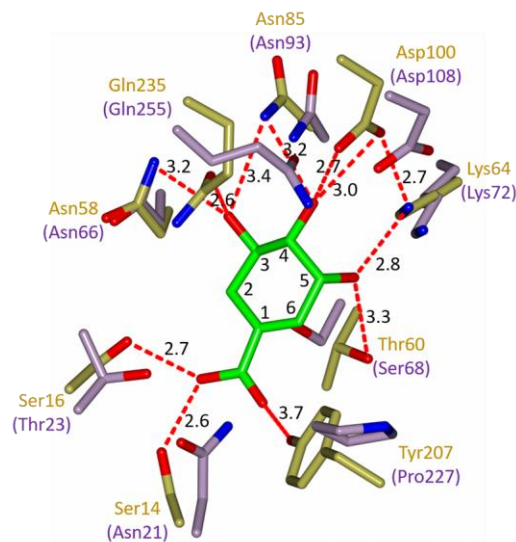


図 3 : 基質結合部位の比較

そこで、酢酸菌の酸化発酵の一つであるフルクトース発酵に注目して、産出される 5KF を基質にしたところ、N-His GTH1149 の 5KF に対する還元反応の比活性が約 300 U/mg もあることが分かった。DHA および 5KF はどちらも共通部分を持つ単糖の一種であることから、GTH1149 は図 4 で示したような基質特異性を持っているといえる。

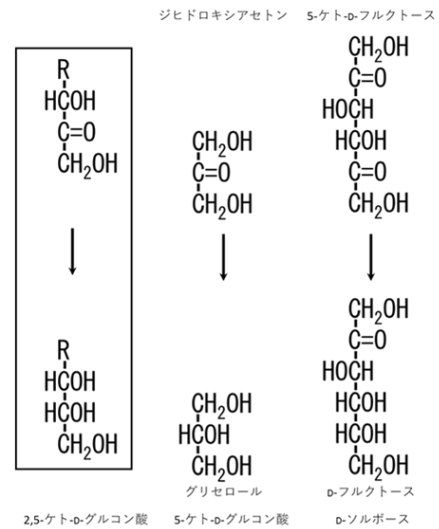


図 4 : GTH1149 の触媒反応

4 まとめ

以上の結果から、GTH1149 は、これまで未同定であった 5KF 還元酵素であることが判明した。また、基質特異性モデル (図 4) から、この酵素は様々な酸化発酵に関わる可能性のある重要なタンパク質であるということが示唆された。

ゲノムの塩基配列が明らかとなっている *Gluconobacter* 属の酢酸菌において、SKDH の遺伝子は、二つずつアノテーションされている。これらのアミノ酸配列をもちいて系統樹を作成したところ (図 5)、SKDH とアノテーションされている遺伝子は、GTH1149 を含むグループと含まないグループにわかれたことから、*Gluconobacter* 属の酢酸菌は、どれも SKDH と 5KFR (GTH1149) の遺伝子をそれぞれ一つずつ保持しているということが新たに明らかとなった。

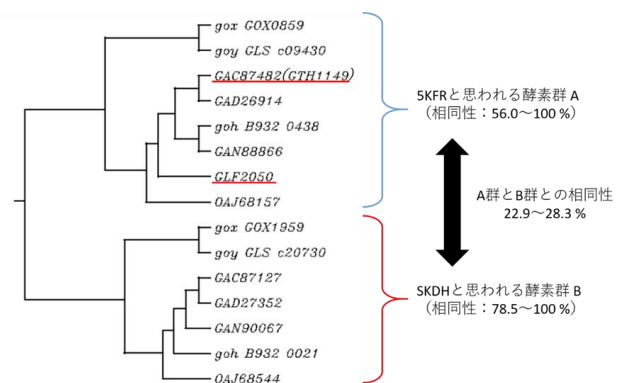


図 5 : SKDH としてアノテーションされている酵素の系統樹

* goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp