

## Ergothionase の触媒反応メカニズム The Catalytic Mechanism of Ergothionase

岡崎 紗代子<sup>1</sup>、緒方 康平<sup>1</sup>、宮本 智也<sup>1</sup>、後藤 勝<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 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

Okazaki Sayoko<sup>1</sup>, Ogata Kohei<sup>1</sup>, Miyamoto Toshiya<sup>1</sup>, Masaru Goto<sup>1</sup>

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

### 1 はじめに

自然界に存在する水溶性の抗酸化物質として知られている ergothioneine はイミダゾール環の C2 原子に付したチオール基を含むヒスチジンのベタイン誘導体である。ergothioneine の生理的な機能はいまだ明らかではないが、fungi、mycobacteria、カブトガニ、または哺乳類を含む多くの生きた生物中に存在することがわかっている。特に、哺乳類において ergothioneine は、眼球や精漿と同様に、肝臓、腎臓、心臓、皮膚、肺、脾臓、小腸、血液、赤血球に特に多く見出されている。しかし、ヒトの細胞は ergothioneine を生合成出来ないため、ヒトの身体は ergothioneine を、キノコ、豆、麦ぬか、にんにくや肉製品などの食料源から、OCTN1 と呼ばれる特異的なトランスポーターを通じて吸収し、さまざまな組織や細胞に蓄積している。この OCTN1 遺伝子はリュウマチ様関節炎との関連や、ヨーロッパの人々のクローン病の感受性に直接関わっていることが報告されている。fungi や mycobacteria における ergothioneine 生合成経路は、よく知られている一方で、代謝経路についてはほとんど知られておらず、大腸菌の細胞破砕液において、Ergothionase 活性があることが報告されているだけであった。そこで、われわれと共同研究をしている高知大の村松は、*Burkholderia sp.*由来のこの酵素の遺伝子の同定、精製サンプルのキャラクタリゼーションを行い、この酵素 Ergothionase が ergothioneine の代謝経路の第一段階の反応を触媒することを明らかにしている[1]。Ergothionase のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質としてヒットするのは、histidine ammonia-lyase および phenylalanine ammonia-lyase であり、それぞれ 23% および 17% の相同性を有している。どちらの酵素も、Ala-Ser-Gly という三つ組みのペプチドの配列から自発的に起こる脱水反応によって、一般的ではない求電子的な 4-methylideneimidazole-5-one (MIO) 基を形成する。このようにペプチドから自発的に形成される触媒基はビルトイン型補酵素と呼ばれている。MIO 基は、アンモニアリアーゼ反応において触媒として重要な働きをするが、Ergothionase において、この元となる三つ組みのペプチド配列は保存されていない[1]。そのため、この Ergothionase

が、MIO 基にかわる新奇なビルトイン型補酵素を持つのか、また、どのような反応機構で ergothioneine の代謝分解を触媒しているのかを解き明かすために、われわれは Ergothionase の X 線結晶構造解析を行った。

### 2 実験

ネイティブ ERTase の結晶は、PEG4000 と塩化マグネシウムを主な沈殿剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で析出した。Photon Factory を利用して収集した 1.50 Å 分解能の X 線回折強度データから、Tyrosine Aminomutase (PDB entry : 2OHY) を初期モデルとした分子置換法によって位相を決定し、立体構造の構築を行った。ネイティブ ERTase の立体構造は、Rfactor = 18.9% および Rfree = 20.4% の精度で決定した。ERTase と基質類似物 2-Mercapto-4-methylimidazole との複合体 (ERTase・MMI) の結晶は、ネイティブ ERTase 結晶を MMI 含有リザーバーにソーキングすることで得た。ERTase・MMI 複合体の立体構造は、2.00 Å 分解能で Rfactor = 19.9% および Rfree = 23.3% の精度で決定した。

### 3 結果および考察

ネイティブ ERTase の活性部位構造の電子密度から、MIO 基は確かに存在しないことが確認できた (図 1)。しかし、その電子密度は通常のペプチド構造を示し、新奇のビルトイン型補酵素の存在は否定された。プログラム DALI の結果より、ERTase と立体構造の相同性が 30% より高いものには MIO 基が存在することがわかった。その一方、MIO 基を必要としない Fumarase および Crystallin などの Aspartase / Fumarase スーパーファミリーに属する酵素は、ERTase とそれぞれ 9.7% および 11.6% の相同性しかもたないことが明らかになった。ERTase・MMI 複合体と Aspartase / Fumarase スーパーファミリーの活性部位構造の比較から、触媒残基の一つは Tyr51 であることを予想し、ERTase の反応機構は E1cB 機構 (ホフマン脱離) であると提案した (図 2)。

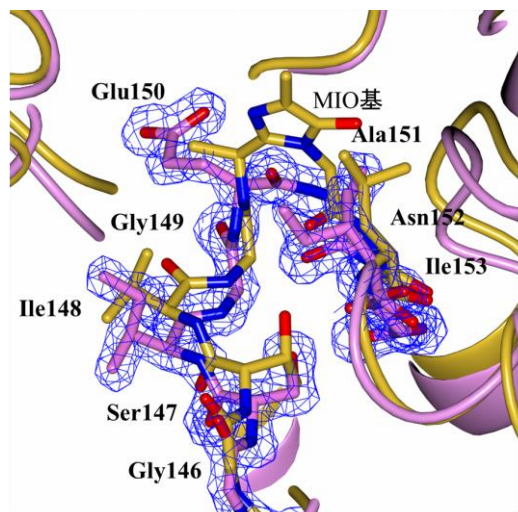


図 1 : 触媒部位構造

ダークピンクは ERTase を、ゴールドは Phenylalanine Aminomutase (PDB entry : 3UNV) を示す。青メッシュは ERTase の  $2F_o - F_c$  電子密度マップ ( $1.5 \sigma$ ) を表示している。

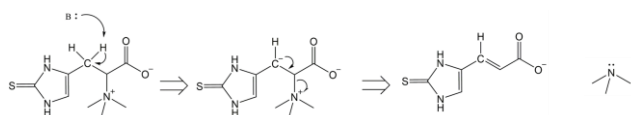


図 2 : 提案した反応機構

#### 4 まとめ

次の2点のために ERTase は MIO 基なしで、その触媒反応を遂行できると考えた。1) 芳香族とカルボキシル基との間に二重結合ができると、共役系がのびるため安定性が増す。2) アミノ基よりもトリメチルアンモニウム基の方が脱離しやすく、強い求電子力を必要としない。

#### 参考文献

- [1] Muramatsu, H., Matsuo, H., Okada, N., Ueda, M., Yamamoto, H., Kato, S., Nagata, S. (2012). *Appl Microbiol Biotechnol* **10**, 1007-1018.

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