

カテコール生合成酵素の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of enzymes involved in catechol biosynthesis

中村 顕¹, 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

Akira NAKAMURA¹ and Masaru TANOKURA^{1,*}

¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

1 はじめに

カテコールは、酸化防止剤や重合防止剤として使われる他、殺虫剤、香料（バニリン、エチルバニリン）、医薬品（L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン; L-DOPA）などの合成原料としても使われる有用な化合物である。また、カテコールの酸化開裂によって生成される *cis,cis*-ムコン酸は水素添加によって 6,6-ナイロンの原料となるアジピン酸となるなど、機能性高分子や熱可塑性エラストマーの原料としての用途が期待されている。工業的には石油からベンゼンを生産し、クメン法などによってフェノールへと変換した後、過酸による酸化反応によってカテコールが合成される。近年、微生物の糖代謝経路を利用し、グルコースから 3-デヒドロシキミ酸、プロトカテク酸を経由する生合成経路が提唱された[1]。しかし、本経路では、プロトカテク酸からカテコールへの変換率が低く、プロトカテク酸脱炭酸酵素の反応効率化が生産量向上における課題とされている。本研究では細菌由来のプロトカテク酸脱炭酸酵素の立体構造を決定し、その反応機構を明らかにするとともに、酵素の高機能化に資する知見を得ることを目的とした。本研究成果は化石燃料に依存せずにカテコールを生産するバイオプロセスの構築に貢献しうる。

2 実験

プロトカテク酸脱炭酸酵素を大腸菌において N 末端 His タグ融合タンパク質として大量発現させ、Ni アフィニティ精製の後にタグを切断し、陰イオン交換およびゲル濾過によって高純度に精製した。蒸気拡散法によりマロン酸を主成分とする条件で得たプロトカテク酸脱炭酸酵素の結晶を用い、AR NW12A ビームラインにて 2.12 Å 分解能の回折強度データ (Native) を収集した。また、ヨウ化ナトリウムを含む溶液に浸漬した結晶から実験室 X 線を用いてヨウ素誘導体結晶の回折強度データ (ヨウ素誘導体) を 2.69 Å 分解能で収集した。この他、生成物であるカテコールを含む溶液に短時間浸漬した結晶を用いて、AR NW12A ビームラインにて 2.00 Å 分解能での回折強度データ (カテコール結合型) を収集した。

3 結果および考察

ヨウ素誘導体データを用いた SAD 法により初期位相を決定した。その後、Native データを用いた構造精密化により、プロトカテク酸脱炭酸酵素の結晶構造を 2.12 Å 分解能で決定した。

構造解析の結果、ドメインスワッピング二量体が三分子会合した六量体を形成していることが示唆された (図 1)。これはゲル濾過の結果とも矛盾しない。

カテコール結合型のデータにおいては、予想される活性部位近傍にカテコールと考えられる電子密度が観察された。

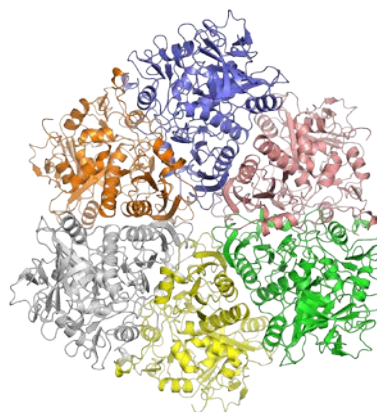


図 1: プロトカテク酸脱炭酸酵素の六量体構造

4 まとめ

プロトカテク酸脱炭酸酵素の結晶構造を決定するとともに、生成物であるカテコールの結合部位に関する知見が得られた。

謝辞

Photon Factory のビームラインスタッフの皆様にご感謝致します。

参考文献

[1] C. Weber, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8421 (2012).

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