

リジン水酸化酵素とリジン酸化酵素の基質認識メカニズム

The substrate recognition mechanism of lysine hydroxylase and lysine oxidase

宮本 智也、岡崎 紗代子、東 翔子、後藤 勝*

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

Toshiya Miyamoto, Sayoko Okazaki, Shoko Higashi, Masaru Goto

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

1 はじめに

キラリティーが生物学的活性に大きな役割を果たす医薬分野において、キラリ化合物の立体異性体の分離方法は有用な化合物の合成のため重要である。その中でも、ヒドロキシリジンおよびその環化した化合物であるヒドロキシピペコリン酸は、二つのキラ中心と、容易に誘導できる官能基をもつことから、医薬分野の方面で高い関心を持たれている。例えば、ヒドロキシ-L-リジンは、プロテインキナーゼC阻害剤である Balanol 前駆体として、またヒドロキシ-L-ピペコリン酸は、HIV プロテアーゼ阻害剤 Palinavir 前駆体および抗腫瘍活性のある Bengamide-B 前駆体として利用できると報告されている。ヒドロキシリジン誘導体を医薬品合成に利用するためには、高い純度での合成はもとより、ヒドロキシ基の位置選択性および立体選択性の制御が必要である。しかし、ヒドロキシリジンおよびヒドロキシピペコリン酸には、二つの不斉炭素から4種類の異性体が存在し、それら単独のジアステレオ異性体の化学合成は依然として複雑であり、工業的規模で実施するのが難しい。一般的に、酵素反応は、高い基質特異性、位置選択性、および立体選択性のためキラ選択的合成に有利である。そのため近年、低コストでの生産、エネルギー消費、および廃棄物を減少させる医薬品製造プロセスに、酵素をもちいたヒドロキシル化技術を利用する要求が高まっている。この目的を追求するために長年にわたって、アミノ酸水酸化酵素に関する広範囲な研究が行われてきた。そこでL-リジンを出発物質とし、複数の酵素をもちいてヒドロキシ-L-リジンおよびヒドロキシ-L-ピペコリン酸を合成する方法が考えられている (WO2014/129459 および WO2014/098188)。その1段階目では、L-リジン-4-水酸化酵素が、L-リジンの4位を水酸化し、4*R*-ヒドロキシ-L-リジンを生成する (図1)。2段階目では、L-リジン- α -オキシダーゼをもちいて、ヒドロキシ-L-リジンのアミノ基をイミノ基に変換にし、その後の自己環化によって Δ^1 -ピペリジン-2-カルボン酸が生成する (式)。3段階目では、*N*-メチル-L-アミノ酸デヒドロゲナーゼ

が、 Δ^1 -ピペリジン-2-カルボン酸の二重結合を単結合へ変換し、ヒドロキシ-L-ピペコリン酸を生成する。L-リジンの水酸化は、リジン水酸化酵素 (EC 1.14.11.4) によって触媒される。ヒドロキシ-L-リジン誘導体の医薬品の出発物質としての有用性と、生物学的挙動の理解を拡大するために、ヒドロキシ-L-リジンのヒドロキシ基の位置および立体選択性の解明が必要である。我々は、この合成法に利用される酵素のうち、立体構造の明らかとなっていない前者二つに注目した。本研究では、*Niastella koreensis* 由来の Fe(II)/ α -ケトグルタル酸依存性 L-リジン-4-水酸化酵素 (Nk4KH) の立体構造情報から C4 位に *R* 配座でヒドロキシ基を付与するメカニズムを明らかにするために、また、マサバ *Scomber japonicus* 内臓由来の FAD 依存性 L-リジン- α -オキシダーゼ (SjLAO) については、基質認識機構を基にするヒドロキシ-L-リジンに対する活性の増加に向けた酵素改良のために、PF を利用した X 線結晶構造解析を行った。

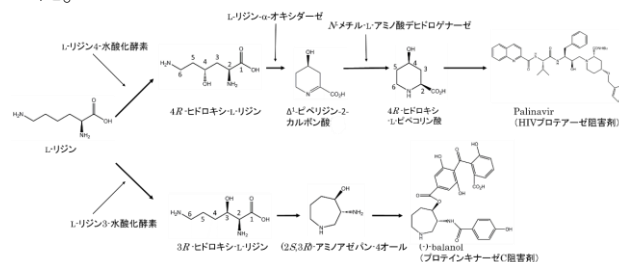


図1 医薬品材料のジアステレオマー選択的合成

2 実験

Nk4KH と L-リジンの複合体 (Nk4KH · Lys 複合体) の結晶は、PEG3350 と酢酸カルシウムを含む条件で析出した。Nk4KH · Lys 複合体結晶の X 線回折強度データは、PF-AR のビームライン NW12A において 1.75 Å 分解能まで収集した。Nk4KH · Lys 複合体の結晶構造は、初期モデルとして *Streptomyces vinaceus* 由来の L-アルギニン-3-水酸化酵素 (アミノ酸配列の相同性 20.1 % ; PDB entry : 2wbo) をもちいた分子置換による位相の決定のあと、*Arp/Warp* をもちいた自動モデル構築に

より組み上げられた (図 2)。最終的な Nk4KH・Lys 複合体の立体構造は、 $R_{\text{factor}} = 0.211$ および $R_{\text{free}} = 0.241$ の精度で決定できた。

ネイティブ SjlAO の結晶は、硫酸アンモニウムを沈殿剤とする結晶化条件で得ることが出来た。L-リジンまたはヒドロキシ-L-リジンとの複合体の結晶は、ネイティブ SjlAO の結晶にヒドロキシ-L-リジンを約 1 時間ソーキングすることによって作成した。ヒドロキシ-L-リジンの合成は、L-リジン-3-水酸化酵素の発現株の休止菌または Nk4KH の精製酵素を L-リジンと反応させることで行った。SjlAO の X 線回折強度データセットは、PF と PF-AR のビームライン NE3A、NW12A、および BL-5A において収集した。ネイティブ SjlAO の結晶構造の位相の決定は、初期モデルとして *Agkistrodon halys* 由来の L-アミノ酸オキシダーゼ (アミノ酸配列の相同性 41.3 % ; PDB entry : 1tdn) をもちいた分子置換により行った。構築できた立体構造は、ネイティブ SjlAO、L-リジンとの複合体、3*S*-ヒドロキシ-L-リジン複合体、4*R*-ヒドロキシ-L-リジン複合体、および 5*R*-ヒドロキシ-L-リジン複合体の 5 種類であり、それらは、それぞれ $R_{\text{factor}} = 0.177 \sim 0.200$ および $R_{\text{free}} = 0.206 \sim 0.240$ の精度で決定できた。

3 結果および考察

Nk4KH・Lys 複合体の活性部位構造から、L-リジンの α -カルボキシル基、 α -アミノ基、および ϵ -アミノ基は、それぞれ Asn230 残基と Arg336 残基、Gln142 残基と Glu176 残基、および Asp258 残基によって主に認識されていることが明らかになった。活性部位には、結晶化溶液由来の酢酸イオンが二つ結合しており、それらの配置から、基質 α -ケトグルタル酸の二つのカルボキシル基は、活性発現に必須の鉄イオンおよび周辺の Arg332 残基と相互作用することが推定できる。このことから、Nk4KH の反応メカニズムは、Fe(II)/ α -KG 依存性ヒドロキシラーゼファミリーと同じであると示唆される。また、Nk4KH と L-アルギニン-3-水酸化酵素との活性部位構造の比較により、基質アミノ酸の主鎖との相互作用に関わる Arg143 残基および Gly164 残基によって位置選択性が制御されていることが明らかとなり、4-位選択性酵素と 3-位選択性酵素の相互変換の知見を得ることができた。

SjlAO は結晶中で 2 量体を形成していた (図 3)。SjlAO・Lys 複合体の活性部位では、L-リジンの α -カルボキシル基、 α -アミノ基、および ϵ -アミノ基は、Arg115 残基と Trp401 残基の側鎖、Ala490 残基の主鎖、および Asp248 残基の側鎖と水分子を介した Asp348 残基の側鎖によってそれぞれ認識されていることが明らかになった。ソーキングには立体異性体混合物である (*RS*) -5-ヒドロキシ-DL-リジンをもちいたにもかかわらず、活性部位の電子密度からは、5*R*-ヒドロキシ-L-リジンのみが結合しているこ

とがわかった。これは、 α -カルボキシル基および α -アミノ基の結合様式に加えて、FAD の *re* 面からのヒドリド移動という反応機構による D 体の排除が、また、疎水的な Phe456 残基による *S* 配座のヒドロキシ基の排除が原因であると考えられる。

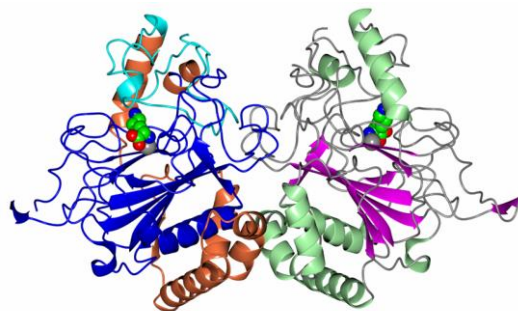


図 2 : Nk4KH の全体構造

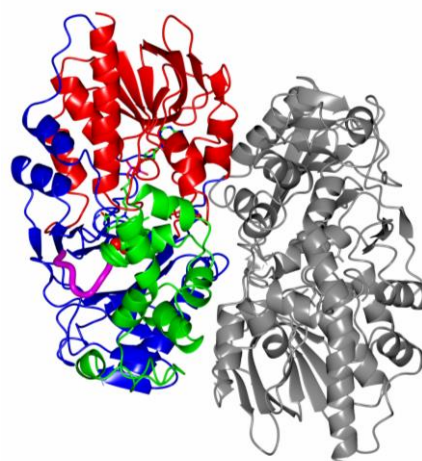


図 3 : SjlAO の全体構造

4 まとめ

Nk4KH・Lys 複合体の活性部位構造から、基質 L-リジンの α -カルボキシル基は、Asn230 残基と Arg336 残基、 α -アミノ基は、Gln142 残基と Glu176 残基および ϵ -アミノ基は、Asp258 残基によって認識されていることがわかった。Nk4KH は、基質選択性が高いため活性部位が狭く、L-リジンより大きい基質は Asp258 残基および Ala260 残基が原因で結合することができないことが推測された。

ネイティブ SjlAO と SjlAO・Lys 複合体の比較により、基質結合時に活性部位を閉じる働きをする蓋ループが存在することがわかった。ヒドロキシリジンが結合すると、その蓋ループに更なるコンホメーション変化が起こり、ヒドロキシ基と蓋ループの Val224 残基が接近する歪みができることが確認された。蓋ループ内の疎水性残基の親水性残基へ置換をすることでヒドロキシ-L-リジンに対する相対活性が約 10 % と低い SjlAO の高活性型変異体として Val224Asn および Val224Gln の 2 種類を提案した。