

PLP 依存性 D-スレオニンアルドラーゼの基質認識メカニズム

The substrate recognition mechanism of D-threonine aldolase

平戸祐喜^{1,*}, 後藤勝^{1,†}¹ 東邦大学理学部, 生物分子科学科

〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

Yuki HIRATO^{1,*} and Masaru GOTO¹¹Toho University, Faculty of Science,

Department of Biomolecular Science,

2-2-1 Miyama, Funabashi-shi, Chiba 274-8510, Japan

1 はじめに

D-スレオニンアルドラーゼ (DTA) は、ピリドキサーール 5'-リン酸 (PLP) および二価の金属イオン依存的に D 型のβ-ヒドロキシα-アミノ酸の分解と合成を触媒する酵素である。DTA は、厳密なα位の認識と寛容なβおよびγ位の認識という立体特異性により、D-フェニルセリンなど様々なアミノ酸合成に利用できることから、医薬品原料などの不斉合成や光学分割への応用が期待されている。一方で、その立体特異性により目的物質のジアステレオマーも同時に反応に関与することとなる。そのため、立体特異性を厳密にする DTA の変異体作製をする試みが報告[1]されているが、DTA の基質認識機構の詳細は未だ明らかでない。

DTA は合成反応とその逆反応である分解反応を触媒する。その合成反応では補酵素 PLP と第一基質のグリシンの結合に引き続き、第二基質のアルデヒドの接近によって進行すると考えられている[2]。本研究では、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来の DTA (CrDTA) の基質認識機構を明らかにするために、CrDTA とグリシンとの複合体結晶へアルデヒドをソーキングすることで得た酵素基質三者複合体の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

CrDTA 結晶はポリエチレングリコール 4000 または 3350, ヘキシレングリコール, およびジメチルスルホキシドで構成された結晶化溶媒によって析出させた。CrDTA とグリシン複合体 (Gly 複合体) のデータセットは CrDTA に第一基質のグリシンを含む結晶化溶液を 20 min ソーキングした結晶より得た。第二基質であるアルデヒドを含む結晶は、上記結晶化条件にグリシンを添加して析出した CrDTA とグリシン共結晶へ 3-ニトロベンズアルデヒド (NBA) および *n*-ヘキシルアルデヒド (HA) をそれぞれ結晶へ 60 min および 7 min 浸漬することで得た。それぞれのアルデヒドを含んだ CrDTA 結晶を Gly+NBA 複合体および Gly+HA 複合体とした。すべての回折強度データは、PF または PF-AR の結晶構造解析ビームラインで収集した。回折データは XDS にて処理し、Scala

でスケーリングを行った。位相は、基質を含まない CrDTA (ネイティブ CrDTA, PDB ID: 7YQA) の座標を初期モデルとした MolRep による分子置換法で決定した。立体構造の座標のモデリングと精密化は Refmac5 および Coot を用いて行った。また、酵素と基質の相互作用は Web アプリの PLIP を用いて解析した[3]。

3 結果および考察

Gly 複合体, Gly+NBA 複合体, および Gly+HA 複合体の結晶構造はそれぞれ 2.10 Å, 1.90 Å, および 2.10 Å の分解能で決定された (表 1)。ネイティブ CrDTA の結晶構造では、空間群が P1 で、非対称単位内にホモダイマー二つを含む四つの CrDTA 分子が含まれていたが、今回得られた複合体の結晶構造では空間群はすべて P₄2₁2 であり、非対称単位内に二つの CrDTA 分子がホモダイマーとして確認された。

表 1: CrDTA の X 線結晶データセット

Complexed substrate	Gly	Gly+NBA	Gly+HA
Beamline	BL-5A	NE-3A	NE-3A
Max resol. (Å)	2.10	1.90	2.10
Space Group	P ₄ 2 ₁ 2	P ₄ 2 ₁ 2	P ₄ 2 ₁ 2
R/R _{free}	0.219/0.271	0.219/0.244	0.238/0.290

Gly 複合体の活性部位構造を見ると、基質のグリシンのアミノ基は PLP とシッフ塩基 (外部アルジミン) を形成しており、グリシンは第一基質として活性中心へ組み込まれていることが確認できた。第一基質のグリシンのカルボキシ基は Lys80 残基のε-アミノ基および Arg180 残基のグアニジノ基と塩橋を形成しており、また、隣接するホモダイマーサブユニットの Asp353 (Asp353*)残基における主鎖アミド NH 部分と 2.6 Å の距離で水素結合していることが分かった。

Gly+NBA 複合体では PLP と第一基質のグリシンによる外部アルジミンと第二基質の NBA が隣接した状態の ES 複合体モデルが得られた (図 1A) . Gly+NBA 複合体における第一基質のグリシンは Gly 複合体構造と比べ位置が変化していないことがわかった. NBA は PLP の *Re* 面側に位置しており, そのアルデヒド基が PLP とグリシンのシッフ塩基窒素と 3.1 Å の距離に位置していた. NBA のアルデヒド基は Tyr210 残基の側鎖のヒドロキシ基と作用することができる 3.3 Å の距離に位置していた.

Gly+HA 複合体結晶では, 不斉合成物である (2*R*,3*S*)-2-アミノ-3-ヒドロキシオクタン酸と PLP が結合した状態の反応中間体構造が得られた (図 1B) . 合成物のカルボキシ基はグリシンの時と同じように 3 残基と塩橋または水素結合を形成していた. 合成物のβ-ヒドロキシ基と Tyr210 残基は 2.6 Å の距離で水素結合していた. 原核生物由来 DTA の研究において, 基質または合成物のβ-ヒドロキシ基は DTA 活性に必要な 2 価金属イオン (CrDTA では Mg^{2+} イオン) に配位するだろうと予測されている [4]. しかしながら, 本研究において, Mg^{2+} イオンとそのヒドロキシ基は 5.8 Å の距離でありこれらの配位は確認されなかった.

DTA の触媒残基は CrDTA における His216 残基や Tyr210 残基, Lys80 残基などではないかと推定や議論がなされている[1,4,5]. 今回の第二基質を含んだ複合体結晶ではどちらも Tyr210 残基のヒドロキシ基と相互作用する位置に基質のアルデヒド基やヒドロキシ基が作用できる位置にいた. そのため, NBA のアルデヒド基と Tyr210 残基の相互作用は第二基質を安定した位置に固定するだけでなく, チロシンのヒドロキシ基によるアルデヒド基へのプロトン供与が合成反応の引き金になるかもしれないと考えられる. また, 分解反応においてもβ-ヒドロキシ基のプロトン引き抜きが Tyr210 残基のヒドロキシ基によって起こる可能性がある.

4 まとめ

CrDTA の基質複合体構造は基質のソーキングによって得ることができた. 第一基質のカルボキシ基の位置は反応の状態に関わらず一定であった. 第二基質との合成反応および分解反応において Tyr210 残基のヒドロキシ基は基質の酸素原子と隣接しており, プロトンの授受を担っていると考えられた.

謝辞

X 線回折実験を進行するにあたり, 実験のサポートをくださったフotonファクトリーのビームラインに携わるスタッフの皆様へ深く感謝いたします.

参考文献

- [1] S. Park *et al.*, *ACS Catal.* **11**, 6892-6899 (2021).
- [2] S. E. Franz and J. D. Stewart, *Advances in Applied Microbiology* **88**, 57-101 (2014).
- [3] M. F. Adasme *et al.*, *Nucleic Acids Research* **49**, W530-W534 (2021).
- [4] M. K. Uhl *et al.*, *Pros One* **10**(4), e0124056 (2015).
- [5] Y. Hirato *et al.*, *Acta Cryst.* **F79**, 31-37 (2023).

* yuki.hirato@sci.toho-u.ac.jp

† goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp

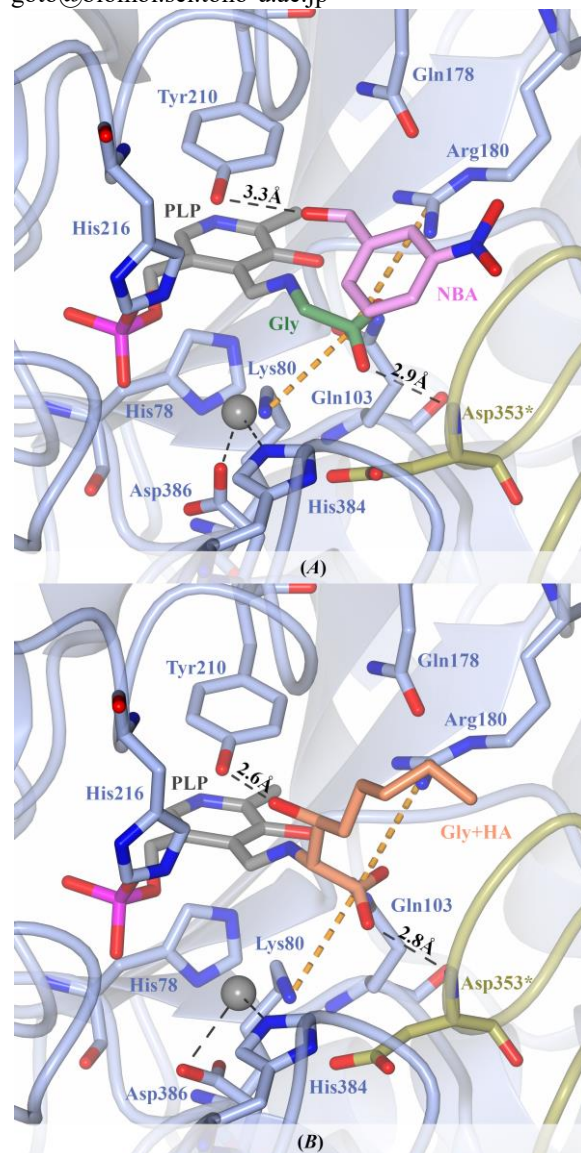


図 1 : CrDTA の基質複合体構造における活性中心図
 ライトブルーは CrDTA サブユニットを示し, ゴールドは隣接するホモダイマーサブユニットを示す. PLP (グレー) はスティックモデルで, Mg^{2+} イオン (グレー) は球体モデルで示す. 黒破線は水素結合をオレンジ破線は塩橋を示す. (A) Gly+NBA 複合体. PLP と結合したグリシンはグリーン, NBA はピンクで示す. (B) Gly+HA 複合体. PLP と結合した(2*R*,3*S*)-2-アミノ-3-ヒドロキシオクタン酸複合体はオレンジで示す.