

## L型糖を基質とする代謝酵素の立体構造解析 Structural study of an enzyme catalyzing L-glucose

深野和紘<sup>1</sup>、清水哲<sup>2</sup>、佐々木康幸<sup>1</sup>、高谷直樹<sup>2</sup>、中村顕<sup>2</sup>、矢嶋俊介<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学バイオサイエンス学科、〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1

<sup>2</sup>筑波大学生命環境系、〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

### 1 はじめに

酵素には「基質特異性」と「反応特異性」がある。そのために生物には「ホモキラリティ」という現象がみられる。「ホモキラリティ」とは、生物が鏡像異性体のうちの一方を偏って利用する性質である。鏡像異性体の物理学的性質はほぼ等しいが、「形」は明らかに異なる。ゆえに、酵素は鏡像異性体を区別し、生物は利用しやすい一方のみを効率良く選択するように進化してきたと考えられている。例えば、酵素を構成するアミノ酸は L 体が、栄養源となるグルコースは D 体が利用される。

生物においてグルコースは D 体だけが利用されることは 1940 年に Rudney H. によって示されてから、現在に至るまでの常識である。事実、解糖を始めとした既知の異化経路に働くグルコース代謝酵素は専ら D-グルコースのみを基質として利用する。その一方で、L-グルコースの異化経路は知られておらず、L-グルコースを結合するための「形」も知られていない。

以上の点から、L-グルコースは生物の栄養源にはならないと考えられてきた。しかし近年、筑波大学・中村のチームにより L-グルコースを資化する微生物が複数単離された。そしてそのうち *Paracoccus* sp. 43P 株において、L-グルコース代謝経路の全貌が明らかになった。本代謝経路は、計 6 つの酵素から構成され、大きく 3 つの段階からなる。第一段階は L-グルコースの酸化であり、LgdA により L-グルコースが L-グルコノラクトンへと酸化され、自然酸化によりさらに L-グルコン酸へと変換される。そこで、LgdA の反応機構、基質特異性解明をめざし、立体構造解析を行った。

### 2 実験

*Paracoccus* sp.43P 株由来 L-グルコース脱水素酵素 (LgdA) 遺伝子を含むプラスミド pET21a(+)-*lgdA* を発現プラスミドとして用いた。*lgdA* 遺伝子領域の C 末端には、6 x His-tag が融合している。初期位相決定のために、Se-Met 置換結晶を作成した。Se-Met 置換体の構造は、Se-Peak で集められた SAD データ由来の実験位相を用いて解かれた。実験位相情報から高い品質の電子密度が得られた。そして、Phenix AutoSol を用いて、自動的に構造構築が行われた。

自動で構築されなかったアミノ酸は、Coot を用いて、当てはめた。Native LgdA の apo 構造は、Se-Met 置換体の構造を用いて、1.75 Å の分解能をもって、Molrep を用いて、分子置換法により解を得た。基質および補酵素 NAD<sup>+</sup> との複合体構造はソーキング法により取得した。初期構造は分子置換法を用いた。

### 3 結果および考察

構築された構造は最終的に、 $R/R_{\text{free}}$  がそれぞれ、16.3%/19.3% になるまで、Refmac5 を用いて精密化した。この構造は、4 本のポリペプチド、1346 の水分子、そして 1 つの PEG 分子を含んでいる。LgdA は結晶中でほぼ完全な 222 対象を持つ四量体構造をとっていた。四量体内で最も大きな接触は、四量体の中心部に存在する、拡張された  $\beta$  シート同士の接触である。サブユニット A-B と C-D のそれぞれで、2 つのサブユニットの 8 ストランド  $\beta$  シートが隣り合って 16 ストランド  $\beta$  シート構造をとっていた。四量体の中央でこの拡張  $\beta$  シートが 2 つ向かい合って接触していた。この  $\beta$  シートは顕著な右手ひねりをもっており、全体としてほぼ 180° 回っていた。今回、apo 型酵素の他に、ソーキング法により、基質と補酵素 NAD<sup>+</sup> との 3 者複合体構造の取得にも成功した。L-グルコースと NAD<sup>+</sup> との複合体構造において、4 量体のすべての分子が NAD<sup>+</sup> を結合していた。いずれもニコチンアミド基の環構造およびアミド基の電子密度が明瞭に観察できた。一方で基質は、4 つのサブユニットのうち 3 つにおいて結合が観察された。

### 4 まとめ

今回、L-グルコースを代謝する酵素の立体構造を明らかにした。今後は、変異体などの解析を行い、より詳細な反応機構の解明を目指す。

### 謝辞

データ測定にあたり PF スタッフの方々に深く感謝致します。

\* yshun@nodai.ac.jp