

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¹、清水哲²、佐々木康幸¹、高谷直樹²、中村颯²、矢嶋俊介^{1*}

¹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

²筑波大学大学院生命環境系、〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

¹Kazuhiro Fukano, ²Tetsu Shimizu, ¹Yasuyuki Sasaki, ²Naoki Takaya, ²Akira Nakamura and
¹Shunsuke Yajima

¹Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

²Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba 305-8572, Japan.

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。昨年度 LgdA 立体構造解析を行った。本年度は、2 番目 (LgnH) と 3 番目 (LgnI) の反応を触媒する酵素の立体構造解析に取り組んだ。

2 実験

Paracoccus sp. 43P 株由来 LgnH, LgnI 遺伝子を含むプラスミド pET28a(+)-lgnH および lgnI を発現プラスミドとして用いた。各遺伝子領域の N 末端には、6 x His-tag が融合している。どちらも初期構造はブ

ログラム Phaser を用いて分子置換法により求めた。その後 Phenix の Auto Build 機能を用いて自動構築を行った。構造の精密化には Refmac5 を用い Coot による手動構築と組み合わせ繰り返し精密化を進めた。

3 結果および考察

構築された LgnH 構造は、最終的に 2.3Å 分解能で、 R/R_{free} -factor が 24.8%/27.8% である。結晶中で 2 量体構造をとっていた。興味深いことに、真核生物由来の類縁酵素が 2 量体であるのに対し、通常、原核生物では 4 量体を取っている。得られた構造から、LgnH は 4 量体を形成するための界面が親水性であり、その形成を妨げる要因となっていると考えられた。

反応機構においては、スレオニン残基が重要な残基として知られているが、補酵素 NADH との位置関係から、基質の立体選択性にそれらの配置が重要であると考えられた。

構築された LgnI 構造は、最終的に 2.0 Å 分解能で、 R/R_{free} -factor が 20.0%/22.1% である。結晶中で 4 量体を形成していた。モノマー構造は、補酵素結合ドメインと基質結合ドメインの 2 つからなっていた。得られた構造から反応機構にはチロシン残基が重要であると考えられた。また、活性部位の構造から基質特異性については、今後活性測定等による詳細な検討が必要と考えられた。

4 まとめ

今回、L-グルコースの代謝系における 2 番目と 3 番目の酵素の立体構造を明らかにした。今後は、各種基質との複合体構造解析、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